

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Regina Maruste

**Muropeptiidide toimet statsionaarsest faasist väljumist  
mõjutavate geenide identifitseerimine bakteris  
*Escherichia coli***

Magistritöö

Biomeditsiin

Lõputöö maht (40 EAP)

Juhendaja vanemteadur Arvi Jõers

Tartu 2017

## INFOLEHT

### **Muropeptiidide toimet statsionaarsest faasist väljumist mõjutavate geenide identifitseerimine bakteris *Escherichia coli***

Elutingimuste halvenedes jäävad bakterid metaboolselt inaktiivsesse olekusse ehk soikeseisundisse. Kui elutingimused paranevad, väljuvad osad bakterid soikeseisundist ja hakkavad sekreteerima signaale, mis indutseerivad soikeseisundist väljumist ka ülejäänud bakterites. Bakteri *Escherichia coli* puhul on selliseks signaaliks muropeptiid. Käesoleva töö eesmärk oli saada aimu, millise raja kaudu muropeptiidid indutseerivad soikeseisundist väljumist. Välismembraani poriine kodeeriva *ompF* geeni ja Cpx kahekomponendilisse signaalsüsteemi kuuluva *CpxA* geeni deleteerimisel väheneb muropeptiidide mõju soikeseisundist väljumisele. Cpx signaalsüsteemi kuuluvate geenide *cpxP* ja *cpxR* deleteerimine ei avaldanud mõju muropeptiidide toimet soikeseisundist väljumisele.

Märksõnad: muropeptiid, *Escherichia coli*, signaalmolekul, äratussignaal, peptidoglükaan

CERCS kood: B230; Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Identifying the genes in *Escherichia coli* that affect muropeptide dependent exit from stationary phase**

In growth-permissive conditions, bacteria enter metabolically inactive state (dormant state). When life conditions improve, some of the bacteria exit from dormancy and start to release signals into the medium that induce exit from dormancy in other dormant bacteria. That kind of signal in *Escherichia coli* is muropeptide. Deleting outer membrane porin encoding gene *ompF* or protein CpxA (part of the Cpx two-component signalling system) encoding gene reduces the muropeptide impact on the exit from dormancy. Deleting *cpxR* and *cpxP* (also part of the Cpx two-component signalling system) encoding genes do not play a role in muropeptide sensitivity of growth resumption.

Keywords: muropeptide, *Escherichia coli*, signalling molecule, waking up signal, peptidoglycan

CERCS code: B320; Microbiology, bacteriology, virology, mycology

## SISUKORD

SISSEJUHATUS .....	5
KASUTATUD LÜHENDID.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
1.1 Peptidoglükaan ja muropeptiidid.....	8
1.2. Peptidoglükaani biosüntees ja lagundamine bakteris <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.3. Muropeptiidid signaalina.....	13
1.3.1. Muropeptiid signaalina bakteri ja eukarüootse raku vahel .....	13
1.3.1.1. Interaktsioon pärmiga .....	13
1.3.1.2. Interaktsioon taimega .....	14
1.3.1.3. Interaktsioon loomaga .....	14
1.3.2. Muropeptiid signaalina bakterites ja bakterite vahel .....	16
1.3.2.1. Antibiootikumide resistentsuse induktsioon.....	16
1.3.2.2. Statsionaarsest seisundist väljumise reguleerimine .....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. Töö eesmärgid .....	20
2.2. Materjalid ja meetodika.....	21
2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed, praimerid, puhvrid .....	21
2.2.2 Peptidoglükaani puhastamine ja muropeptiidide preparaadi valmistamine .....	22
2.2.3 Plaadikatse lahjendusreaga .....	23
2.2.4 Statsionaarsest faasist väljumisel muropeptiidele mittereageerivate bakterite s kriining .....	24
2.2.5 Arb-PCR .....	25
2.2.6 Geelelektroforees.....	28
2.2.7 DNA puhastamine geelist ja sekveneerimine .....	28
2.3. Tulemused.....	29
2.3.1 MP mittereageerivad mutandid transposooni raamatukogust.....	29

2.3.2 Transposoonide insertioonide asukohad mutantsete kloonide genoomis .....	30
2.3.3 KEIO kollektsioonist pärit mutantide ärkamiskineetika .....	32
2.3.4 CpxRA signaalsüsteemi mutantide ärkamiskineetika. ....	34
2.4. Arutelu .....	36
KOKKUVÕTE .....	40
SUMMARY .....	41
TÄNUSÕNAD .....	42
KASUTATUD KIRJANDUS .....	43
LIHTLITSENTS.....	49

## SISSEJUHATUS

Bakterid võivad kasvu pärssivad elutingimused üle elada metaboolselt inaktiivses seisundis ehk soikeseisundis. Sellises seisundis olevad bakterid jälgivad pidevalt keskkonda. Kui elutingimused paranevad, toimub soikeseisundist väljumine (nn ärkamine) (Dworkin & Shah, 2010). Kõik soikeseisundis olevad bakterid ei välju soikeseisundist korraga. Geneetiliselt sarnased bakterid võivad jaguneda kaheks või enamaks fenotüübiliselt erinevaks subpopulatsiooniks. Osad soikeseisundis olevad bakterid ärkavad kiiresti, teistel läheb jälle kauem aega oma metabolismi aktiveerimiseks. Sellist strateegiat nimetatakse *bet-hedging*-ks. See kindlustab selle, et kui elutingimused peaksid järsult halvenema, siis kogu populatsioon ei sure, vaid jäävad mõned soikeseisundis olevad bakterid alles, mis hiljem elutingimuste taasparanemisel võivad aluse panna uuele populatsioonile (Jöers & Tenson, 2016). Bakterid, kes enne üles ärkavad, võivad sekreteerida ekstratsellulaarsesse keskkonda signaale, mis äratavad ka ülejäänud alles soikeseisundis olevad bakterid üles. Üheks selliseks signaaliks on näiteks sporuleeruva bakteri *Bacillus subtilis* puhul muropeptiid. Aktiivsel kasvamisel ja jagunemisel vabanevad väliskeskkonda rakukesta koosseisust muropeptiidid. Soikeseisundis olevad bakterid võtavad neid muropeptiide signaalina, et elutingimused on paranenud ja võib käivitada soikeseisundist väljumise mehhanismid (Dworkin & Shah, 2010). Hiljuti on meie laboris avastatud, et muropeptiidid indutseerivad kiiremat soikeseisundist väljumist ka bakteris *Escherichia coli*. Edasi uuriti, kas muropeptiidide metaboliseerimine ja seeläbi soikeseisundist väljumise indutseerimine toimub läbi teadaoleva muropeptiidide taaskasutusraja. Leiti, et muropeptiidid indutseerivad kiiremat soikeseisundist väljumist läbi hetkel veel tundmatu mehhanismi (Marta Pereira, Arvi Jöers, avaldamata andmed). Käesoleva töö eesmärk oli saada rohkem aimu, millise raja kaudu muropeptiidid indutseerivad kiiremat soikeseisundist väljumist ning selleks üritati identifitseerida geene, mis on seotud muropeptiididest sõltuva soikeseisundist väljumisega.

## KASUTATUD LÜHENDID

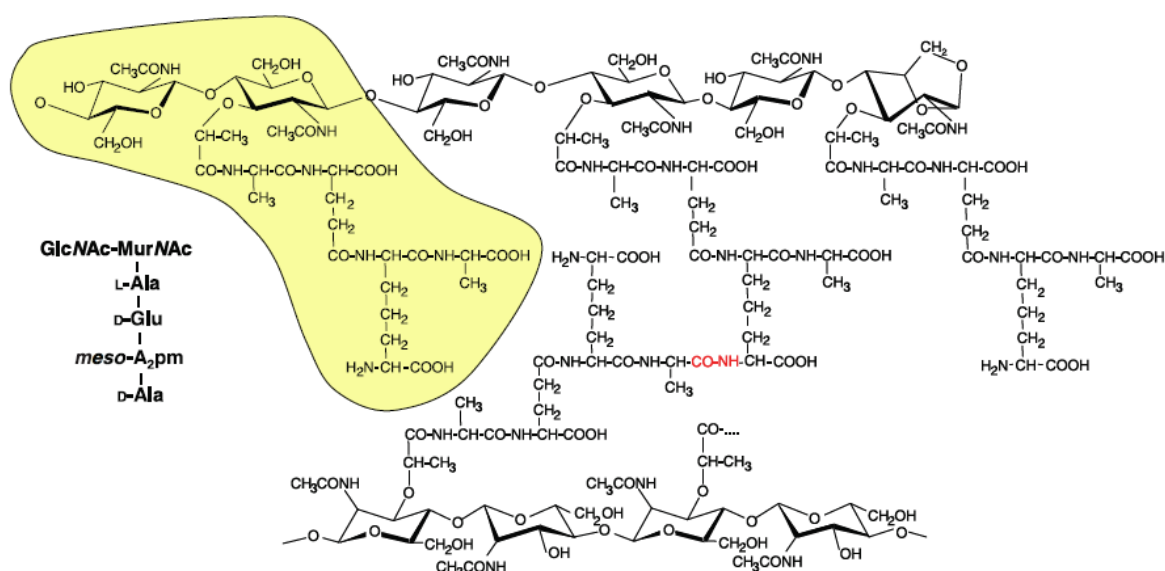
CARD	kaspaasi värbav domeen ( <i>caspase-recruitment domain</i> )
DAP	diaminopimeelhape ( <i>diaminopimelic acid</i> )
DHFR	dihüdrofolaadi reduktaas ( <i>dihydrofolate reductase</i> )
DPA	dipikoliinhape ( <i>dipicolinic acid</i> )
EF-G	elongatsiooni faktor G ( <i>elongation factor G</i> )
g	suhteline tsentrifugaaljõud
GlcNAc	N-atsetüülglükoosamiin ( <i>N-acetylglucosamine</i> )
Glt	glükonaat ( <i>gluconate</i> )
Gly	glütserool ( <i>glycerol</i> )
ILF	isoleeritud lümfoidne folliikul ( <i>isolated lymphoid follicle</i> )
KAN	kanamütsiin
MOPS	3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape (3-( <i>N-morpholino</i> )propanesulfonic acid)
MurNAc	N-atsetüülmuramiinhape ( <i>N-acetylmuramic acid</i> )
Nod	nukleotiidiga seonduv oligomerisatsiooni domeen ( <i>nucleotide-binding ~ oligomerization domain</i> )
OmpF	välimise membraani valk F ( <i>outer membrane protein F</i> )
PAMP	patogeenidega seotud molekulaarsed mustrid ( <i>pathogen associated molecular patterns</i> )
PASTA	penitsilliini ja Ser/Thr kinaasiga seotud ( <i>penicillin and Ser/Thr kinase associated</i> )
PGRP	peptidoglükaani äratundev valk ( <i>peptidoglycan-recognition proteins</i> )
PR	patogeeniga seotud ( <i>pathogen related</i> )
PRR	mustrit äratundev retseptor ( <i>pattern-recognition receptors</i> ).
rpf	kasvamahakkamist soodustav valk ( <i>resuscitation promoting factor</i> )
rpm	pöördeid minutis ( <i>revolutions per minute</i> )

SDS	naatriumdodetsüülsulfaat ( <i>sodium <b>d</b>odecyl sulfate</i> )
UDP	uridiin difosfaat ( <i><b>u</b>ridine <b>d</b>iphosphate</i> )
VBNC	elus, kuid mittekultiveeritav ( <i>viable <b>b</b>ut <b>n</b>onculturable</i> )

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Peptidoglükaan ja muropeptiidid

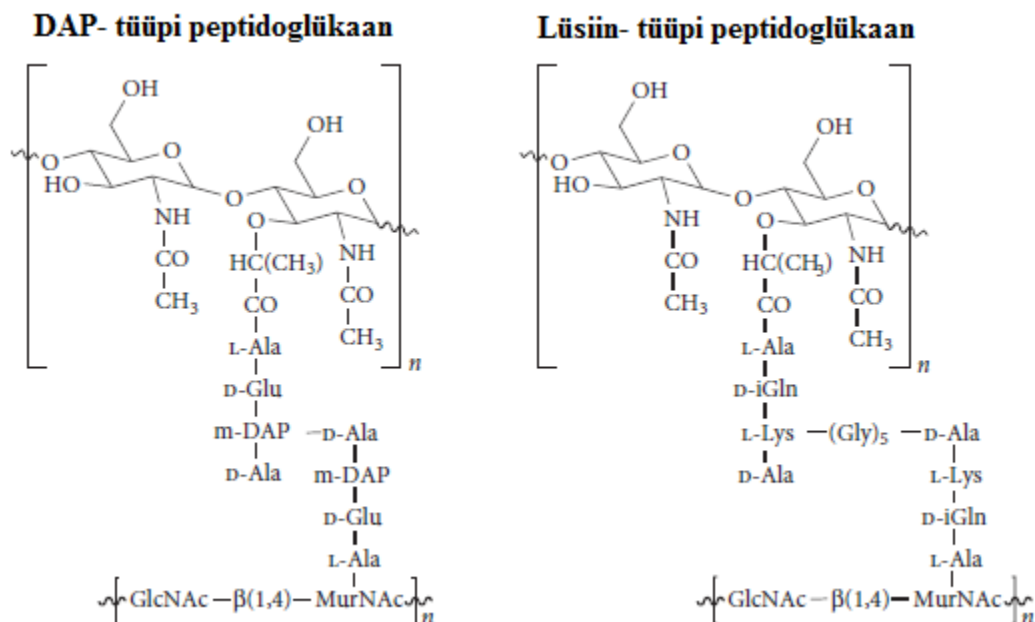
Peptidoglükaan (ehk mureiin) on oluline rakukesta komponent. Seda võib pidada üheks suureks makromolekuliks, mis ümbritseb tervet bakterirakku. Selle peamine funktsioon on hoida rakku tervikuna koos, seistes vastu rakusisesele osmootsele rõhule (Vollmer *et al.*, 2008). Kui peptidoglükaani võrgustikku tekiks auk, siis toimuks rakusisesel osmootse rõhu mõjul bakteriraku lõhkemine. Lisaks aitab peptidoglükaan hoida raku kuju ning osaleb rakujagunemise regulatsioonis. Samuti on see piisavalt poorne, et läbi lasta olulisi toitaineid ja teisi väiksemaid ühendeid (Royet & Dziarski, 2007). Nii gram-positiivsetes kui ka gram-negatiivsetes bakterites koosneb peptidoglükaan lineaarsetest glükaanahelatest. Need omakorda koosnevad vaheldumisi paiknevatest N-atsetüülglükoosamiini (GlcNAc) ja N-atsetüülmuraamhappe (MurNAc) jääkidest, mis moodustavad peptidoglükaani struktuuris selgroo. GlcNAc ja MurNAc jäägid on omavahel seotud  $\beta(1\rightarrow4)$  glükosiidsidemega (Vollmer *et al.*, 2008). Kõik MurNAc jäägi laktüülrühmad on seotud peptiididega, mis tavaliselt sisaldavad nelja L- ja D-aminohapet. Peptiidid on omavahel ristseotud kas otse või lühemate peptiidide kaudu (joonis 1) (Royet & Dziarski, 2007).



**Joonis 1.** Peptidoglükaani struktuur bakteris *Escherichia coli*. Glükaanahel koosneb vahelduvatest  $\beta(1\rightarrow4)$  glükosiidsidemega seotud GlcNAc ja MurNAc jääkidest ning on termineeritud 1,6-anhüdromurNAc jäägiga. Kollane osa märgib põhilist korduvat disahhariid-tetrapeptiidset subühikut (monomeeri). Vasakus servas on ära toodud antud monomeeri skeem. Keskmes osas on näidatud ristseotud peptiidi. Punasega on märgitud amiidrühm, mille kaudu on peptiidide tüved üksteisega seotud (Vollmer *et al.*, 2008).



Polüsahhariidse selgroo struktuur on konserveerunud kõikides bakterites. Esinevad vaid mõned üksikud väikesed variatsioonid. Suuremad erinevused on peptiidide ehituses. Gram-negatiivsetel bakteritel ja gram-positiivsete klassi *Bacillus* esindajatel on peptiidi struktuuris kolmandaks aminohappeks meso-diaminopimeliinhape ehk DAP (joonis 2). Enamikes gram-positiivsetes bakterites on kolmandaks aminohappeks aga L-lüsiin (joonis 2). DAP-tüüpi peptiidid on tavaliselt otse ristseotud, kuid lüsiin-tüüpi peptiidid on seotud oligoglütsiinist koosnevate sildadega, mille pikkus võib varieeruda erinevates bakterites. Lisaks kolmandale aminohappele on gram-positiivsetes ja gram-negatiivsetes bakterites erinev peptidoglükaani hulk. Gram-positiivsetel bakteritel on paks rakukest ning mureiin võib moodustada ligi poole raku kuivmassist. Gram-negatiivsetel bakteritel on õhem ühekihiline mureiinkest, mis asub sisemise plasmamembraani ning välimise membraani vahel (Royet & Dziarski, 2007).



**Joonis 2.** DAP-tüüpi ja lüsiin-tüüpi peptidoglükaanid (Royet & Dziarski, 2007, kohandatud).

Muropeptiidideks nimetatakse selliseid struktuure, mis on tekkinud peptidoglükaani polümeeri ensümaatilisel lagundamisel ehk lühidalt on tegemist peptidoglükaani fragmentidega (Boudreau *et al.*, 2012).

## 1.2. Peptidoglükaani biosüntees ja lagundamine bakteris *Escherichia coli*

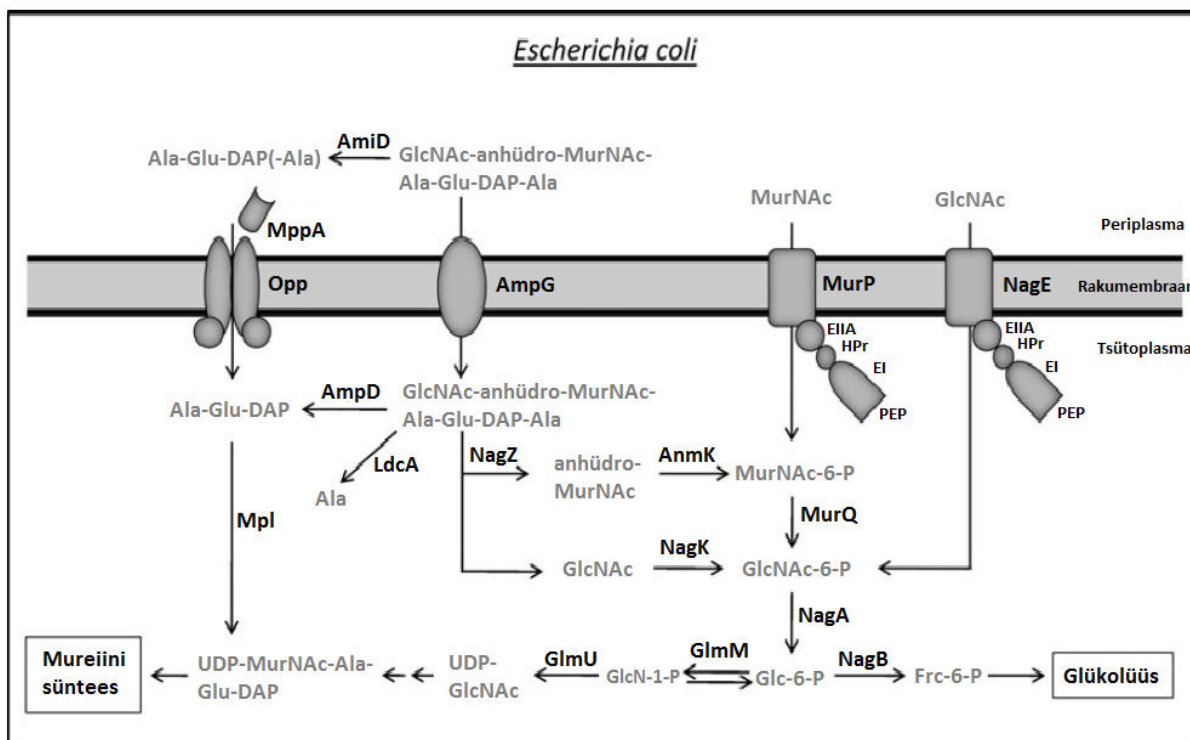
Bakteri *Escherichia coli* soikeseisundist väljumiseks, kasvamiseks ja jagunemiseks on vajalik remodelleerida peptidoglükaani võrgustikku (Adams & Errington, 2009; Dworkin & Shah, 2010). Kui elutingimused halvenevad, võivad bakterid jääda metaboolselt inaktiivsesse olekusse ehk soikeseisundisse. Hetkel teatakse vähe sellest, millised muutused täpsemalt toimuvad *E.coli* peptidoglükaani struktuuris soikeseisundisse minemisel, kuid on leitud, et soikeseisundis on ristsidemete arv suurenenud ning glükaanahelad on lühenenud (Keep *et al.*, 2006). Samuti on mõnel juhul soikeseisundis olev bakter mõõtnetelt väiksem kui aktiivselt kasvav ja jagunev rakk (Stevenson, 1978; Gasol *et al.*, 1995). Kui elutingimused jälle paranevad, hakkavad bakterid uuesti metaboolselt aktiivseks muutuma ja suurenevad mõõtnetelt mõnevõrra (Dworkin & Shah, 2010). Edasi toimub tsüklitena elongatsioon ehk raku pikenemine ja jagunemine kaheks tütarrakuks (Adams & Errington, 2009). Et saaksid toimuda sellised protsessid, kus raku suurus ja kuju muutub, on vajalik muuta ka rakku kooshoidva jäiga struktuuriga rakukesta suurust. Rakukesta kasv on dünaamiline protsess, kus toimuvad samaaegselt nii peptidoglükaani süntees kui lagundamine. Hüdrolaasid teevad peptidoglükaanist rakukesta väikesed sisselõiked. Samal ajal sünteesitakse uut peptidoglükaani, mis sisestatakse sisselõigete kohtade pealt rakukesta koosseisu (Typas *et al.*, 2012).

Nii gram-negatiivsetes kui ka gram-positiivsetes bakterites toimub peptidoglükaani biosüntees põhiliselt kolmes etapis. Esimeses etapis sünteesitakse tsütoplasmas aktiveeritud nukleotiidi prekursorid (UDP-N-atsetüülglükosamiin ja UDP-N-atsetüülmuramüülpentapeptiid). Teises etapis seotakse nukleotiidi prekursorid sisemise membraani tsütoplasma poolisel küljel oleva undekaprenüül-fosfaadiga ning moodustub lipiidiga seotud disahhariid-pentapeptiidi monomeeri subühik (lipiid II). Valk FtsW-RodA keerab lipiid II ümber, nii et nukleotiidi prekursoriga seotud suhkrujääk jääb sisemise membraani periplasmaatilise ruumi poole. Kolmandas etapis katalüüsivad glükosüültransferaasid lipiid II-e polümeriseerimist, mille käigus vabaneb undekaprenüül-pürofosfaat. Selle protsessi tulemusena moodustuvadki glükaanahelad. D,D-transpeptidaasid seovad värskest sünteesitud peptidoglükaanahelad rakku ümbritseva rakukesta koosseisu, ristsidudes omavahel glükaanahelate küljes olevaid peptiide (Typas *et al.*, 2012).

Bakteriraku kasvamiseks on vajalik ka lüüsida peptidoglükaani võrgustikku, et oleks ruumi, kuhu mahuksid värskest sünteesitud glükaanahelad. Ilma lüüsita toimuks lihtsalt rakukesta

paksenemine. Hüdrolaasid on olulised raku kuju, suuruse ja peptidoglükaani paksuse kujundamisel ning on hädavajalikud raku jagunemisel kahe tütaraku lahknemisel. *Escherichia coli*'s on ligi 12 periplasmaatilist peptidoglükaani hüdrolaasi, mis üheskoos võivad lõhkuda pea igat rakukestas olevat glükosiid- ja amiidsidet (Typas *et al.*, 2012). Endopeptidaasid hüdrolüüsivad ristsidet, mis jääb ühe glükaanahelaga küljes oleva D-Ala ja naaber glükaanahela küljes oleva DAP-i vahele. Periplasmas asuvad MurNac-L-Ala amidaasid (AmiA, AmiB, AmiC), mis hüdrolüüsivad MurNac-i ja temaga seotud peptiidahela vahelist sidet. Amidaasid vabastavad mureiinist tri-, tetra- ja pentapeptiide periplasmasse. Transglükosülaasid hüdrolüüsivad glükaanahelas olevate suhkrute MurNac ja GlcNac vahelisi sidemeid ning seeõttu moodustub suhkrujäägis MurNac 1,6-anhüdro side ja tekib anhüdro-MurNac. On olemas ka D,D-karboksüpeptidaasse aktiivsusega ensüümid, mis muudavad suhkrujäägiga seotud pentapeptiidid tetrapeptiideks. Peamine muropeptiid, mida ensüümide poolt rakukesta koosseisust vabastatakse, on GlcNac-anhüdro-MurNac-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-Dap-D-Ala, ehk lühemalt GlcNac-anhüdro-MurNac-tetrapeptiid. Vähemal määral vabaneb GlcNac-anhüdro-MurNac-tripeptiide ja GlcNac-anhüdro-MurNac-pentapeptiide. Suurem osa nendest anhüdromuropeptiididest jääb periplasmasse lõksu (Park & Uehara, 2008). Väike osa neist satub läbi poriinide ekstratsellulaarsesse ruumi (Johnson *et al.*, 2013). AmpG on põhiline permeaas rakukesta taaskasutusrajas, mis transpordib periplasmast tsütoplasmasse GlcNac-anhüdro-MurNac-tetrapeptiide (Park & Uehara, 2008). Lisaks on olemas ka oligopeptiidide transporter Opp, mis transpordib mureiini või osaliselt anhüdromuropeptiidide koosseisust vabastatud tripeptiidid (L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-m-DAP) ja tetrapeptiidid (L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-m-DAP-D-Ala) tsütoplasmasse, ja spetsiifiline fosfotransferaasi süsteem, mis transpordib rakuseinast pärit aminosuhkruid tsütoplasmasse. Tsütoplasmas lagundavad anhüdromuropeptiide N-atsetüülglükoosaminidaas NagZ, anhüdro-MurNac-L-Ala amidaas AmpD ja L,D-karboksüpeptidaas LdcA. Nende töö tulemusena tekivad ühendid GlcNac, anhüdro-MurNac, D-Ala ja L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-mDAP tripeptiidid. Tripeptiidid lisatakse UDP-MurNac-i koosseisu ja tekkinud ühend siseneb mureiini sünteesi rajas. Tripeptiide võidakse ka lagundada üksikuteks aminohapeteks. Mõlemad aminosuhkrud GlcNac ja anhüdro-MurNac konverteeritakse GlcNac-6-fosfaadiks, mis seejärel deatsetüleeritakse ja moodustub GlcN-6-fosfaat. See ühend siseneb kas rakuseina prekursori UDP-GlcNac sünteesi rajas või glükolüüsi kataboolsesse rajas (joonis 3). Kui rakul puuduks võime rakuseina materjalide taaskasutusrada, kaotaks rakk ühe generatsiooniga ligi 45% oma rakuseina ressursidest. Tänu sellele, et *Escherichia coli*'s on olemas selline

taaskasutusrada, kaob iga generatsiooniga vaid 6-8% kogu rakuseina materjalidest keskkonda. Sarnane taaskasutusrada on olemas ka gram-positiivsetes bakterites (Reith & Mayer, 2011).



**Joonis 3.** Peptidoglükaani taaskasutusrada bakteris *Escherichia coli*. Transglükosülaaside ja endopeptasaaside töö tulemusena tekivad periplasmasse anhidromuropeptiidid. Permeaas AmpG on peamiseks anhidromuropeptiidide transportijaks tsütoplasmasse. Oligopeptiidide transporter Opp kasutab spetsiifilist seondumisvalku MppA-d, et transportida periplasmast tsütoplasmasse rakukestast pärit vabu peptiide. Aminosuhkruid transpordib tsütoplasmasse spetsiifilised fosfotransferaasi süsteemid NagE ja MurP. Tsütoplasmas toimub ühendite edasine lagundamine ja saadud produktide edasi suunamine kas mureiini sünteesi või glükolüüsi radadesse (Reith & Mayer, 2011, kohandatud).

Mitmete kliinises kasutuses olevate antibiootikumide sihtmärgiks on kasvavas rakus just peptidoglükaani biosünteesi inhibeerimine (Royet & Dziarski, 2007). Ühed sellised antibiootikumid on  $\beta$ -laktaamid. Nende hulka kuuluvad näiteks penitsilliinid, karbapeneemid ja tsefalosporiinid.  $\beta$ -laktaamid seonduvad transpeptidaasidega, mis muidu katalüüsivad ristsidemete moodustumist peptiidide vahel. Kui transpeptasaadid on seotud antibiootikumiga, siis on nende ensümaatiline aktiivsus inhibeeritud ning glükaanahelaid ei seota enam omavahel läbi peptiidühenduste.  $\beta$ -laktaamide ehituses olev tsükliline amiid ehk laktaam on analoogne peptidoglükaani ehituses olevale terminaalsele D-alanüül-D-alaniin dipeptiidile ning seetõttu on laktaam konkureerivaks inhibiitoriks transpeptidaasidele.  $\beta$ -laktaamide toime on küll rakuseina süntees takistatud, kuid bakteri enda hüdrolaasid jätkavad raku kasvamise ajal peptidoglükaani lagundamist. Lõpuks bakter sureb, sest peptidoglükaanist

rakukesta tehakse sisselõikeid, mida ei täideta uute peptidoglükaani fragmentidega. Bakter ei suuda enam vastu seista raku sees olevale rõhule ning lõhkeb.  $\beta$ -laktaamid mõjuvad nii gram-negatiivsetele kui ka gram-positiivsetele bakteritele. Lisaks  $\beta$ -laktaamidele on olemas ka glükopeptiidid, mis samuti inhibeerivad rakuseina sünteesi. Glükopeptiidid seonduvad peptidoglükaani struktuuris oleva D-alanüül-D-alaniin dipeptiididega ning seeläbi takistavad transglükosülaaside ja transpeptidaaside tööd. Glükopeptiidid on efektiivsed ainult gram-positiivsete bakterite vastu võitlemisel, kuna gram-positiivsete bakterite puhul on parem ligipääs peptidoglükaani võrgustikule. Gram-negatiivsetes bakterites asub rakukest kahe membraani vahel ning pole nii ligipääsetav glükopeptiididele. Lisaks on olemas ka antibiootikumid, mis inhibeerivad muude erinevate peptidoglükaani osade sünteesi, takistavad peptidoglükaani prekursorite transporti tsütoplastmast periplasmaatilisse ruumi või integreeruvad rakumembraani ja depolariseerivad selle (Kohanski *et al.*, 2010).

### **1.3. Muropeptiidid signaalina**

#### **1.3.1. Muropeptiid signaalina bakteri ja eukarüootse raku vahel**

##### **1.3.1.1. Interaktsioon pärmiga**

Bakterid elavad tihti polümükröobsetes kogukondades, kus lisaks neile elavad ka eukarüootsed mikroobid. Üheks selliseks eukarüootseks mikroobiks on pärmseen *Candida albicans*. See seen on osa inimese normaalsest mikrofloorast, kes elab soolestikus, urotrakti limaskestadel ja vähesel määral ka naha pinnal. HIV infektsiooni korral või kui antibiootikumide raviga on elimineeritud konkureerivad mikroobid, võib ta koloniseerida ja tungida ka peremehe teistesse kudedesse ning põhjustada seal põletikku ehk kandidoosi. *C. albicans* võib eksisteerida kolmes erinevas vormis: pärmirakkudena, pseudohüüfsete rakkudena või hüüfsete rakkudena. Võime üle minna eri vormidele on seotud virulentsusega. Hüüfset vormi on vaja teistesse kudedesse tungimiseks ning pärmiraku vorm on vajalik vere kaudu edasi levimiseks (Berman & Sudbery, 2002). Peptidoglükaanist pärit GlcNAc stimuleerib üleminekut pärmis vormist hüüfsesse vormi. Kuna *C. albicans* elab põhiliselt gastrointestinaalses traktis, siis arvatakse, et seal ongi peamiseks GlcNAc-i allikaks läheduses elavad bakterid (Dworkin, 2014). Lisaks võivad muropeptiidid seonduda adenüülül tsüklaasi leutsiini rikka domeeniga valgus Cyr1p ning seeläbi tugevalt soodustada edasist *C. albicans*-i hüüfist kasvu (Xu *et al.*, 2008).

### 1.3.1.2. Interaktsioon taimega

Taimed on õppinud ära tundma erinevaid patogeenidega seotud molekulaarseid mustreid ehk PAMP-e (*pathogen associated molecular patterns*), et ohu korral võimalikult kiiresti sisse lülitada vajalikud kaitsemehhanismid. PAMP-ideks võivad olla prokariotides esinevad erinevad struktuurid ja molekulid, mis on üldlevinud erinevate liikide hulgas. Üheks selliseks molekulaarseks mustriks on enamikes bakterites leiduv peptidoglükaan (Oldroyd, 2013). On leitud, et näiteks bakteri *Staphylococcus aureus* peptidoglükaan või peptidoglükaani töötlemisel lüsostafiiniga saadud muropeptiidid stimuleerivad erinevate kaasasündinud taimsete kaitsegeenide ekspressiooni, sealhulgas geeni PR1 (*pathogen-related, class I*) ekspressiooni taimes *Arabidopsis thaliana*. Bakterite *Xanthomonas campestris* ja *Agrobacterium tumefaciens* muropeptiidid on samuti võimelised indutseerima PR1 ekspressiooni (Dworkin, 2014). PR geenid kodeerivad valke, mille hulka kuuluvad rakuseina hüdrolüüsivad ensüümid ning patogeenide membraani lõhkuvad defensiinid. I klassi kuuluvad need PR valgud, mida hakatakse tootma biotroofsete patogeenide sissetungimisel (Spoel & Dong, 2012). Taimes *Arabidopsis thaliana* on olemas peptidoglükaani äratundmiskompleksid, mis tunnetavad peptidoglükaani ja muropeptiidide olemasolu keskkonnas. Antud kompleks koosneb LysM domeeni (LYM1 või LYM3) sisaldavast valgust ja transmembraansest LysM retseptorkinaasist CERK1. LysM domeenid tunnevad ära peptidoglükaani koostises olevaid oligosahhariide ning seonduvad nendega (Oldroyd, 2013). Seondumisel toimub CERK1 autofosforüleerimine. Edasi toimub immuunvastust vahendavate intratsellulaarsete substraatide transfosforüleerimine ning taimsete kaitsegeenide ekspressioon (Dworkin, 2014).

### 1.3.1.3. Interaktsioon loomaga

Muropeptiidid võivad olla olulised signaalmolekulid looma ja bakteri vahelise sümbioosi loomisel. Näiteks vabastab bioluminestseeruv bakter *Vibrio fischeri* oma rakuseina koosseisust mDAP-tüüpi monomeere, mis koosnevad GlcNAc-ist, MurNAc-ist, D-glutamiinhappest, diaminopimeliinhappest ja kahestalaniinist. Need monomeerid koos lipopolüsahhariididega kutsuvad Hawaii rannikuvetes elutseva kalmaariliigi *Euprymna scolopes*'es esile lima eritumise kalmaari valgusorganist. Selle koha all, kus lima eritub, asuvad väikesed poorid, mis on ühendatud valgusorgani sisemusega. Limasse hakkavad kogunema *V.fischer* bakterid ja sealt liiguvad nad edasi pooride kaudu valgusorgani sisemusse, kus nad hakkavad valgust tootma. Kalmaar kasutab bakterite poolt toodetud valgust selleks, et kuuvalguses varjata oma siluetti temast allpool olevate röövloomade eest. Lisaks on leitud, et

muropeptiidid on olulised ka bakterite perekonna *Wolbachia* esindajate sümbioosi säilitamiseks oma peremehega – ümarussiga (Cloud-Hansen *et al.*, 2006).

Peptidoglükaan ja muropeptiidid on seotud immuunsüsteemi ja soolestiku arengu ning funktsioneerimisega. Näiteks on peptidoglükaan väga oluline imetajate soolestikuga seotud lümfoidse koe arengus. On näidatud, et soolestikus elavate gram-negatiivsete bakterite rakuseinast pärit monomeersed muropeptiidid on võimelised indutseerima isoleeritud lümfoidsete folliikulite (ILF) teket hiirtes. Need folliikulid on olulised tasakaalu hoidmisel soolestiku mikrofloora ja immuunsüsteemi vahel (Dworkin, 2014) ning neil on roll lokaalse immuunvastuse indutseerimisel (Tsuji *et al.*, 2008). Lisaks on leitud äädikakärbeste seedekulglast peptidoglükaani äratundvad valgud (PGRP, *peptidoglycan-recognition proteins*). Üheks peamiseks selliseks sensorvalguks on PGRP-LE, mis tunneb ära ja seondub organismi enda mikrofloorast pärit DAP-tüüpi monomeersete muropeptiididega. Selle seondumise läbi indutseeritakse organismi enda mikrobiota vastu immuuntolerantsus (Bosco-Drayon *et al.*, 2012).

Patogeensete bakterite rakuseina koosseisust vabastatud muropeptiidid on loomadele signaaliks, et patogeenid on tunginud organismi ja on vaja käivitada immuunvastused. Kaasasündinud immuunsüsteemi hulka kuuluvad immuunsensorid, mida kutsutakse mustrit äratundvateks retseptoriteks (PRR, *pattern-recognition receptors*). Need retseptorid on võimelised ära tundma mikroobseid PAMP-e, sh muropeptiide (Boudreau *et al.*, 2012). Imetajates on sellisteks olulisteks retseptoriteks Nod1 ja Nod2 (*nucleotide-binding oligomerization domain -1 and -2*) retseptorvalgud (Chaput & Boneca, 2007). Nendel retseptoritel on kolm domeeni: ligandi äratundev C-terminaalne leutsiini rikas kordusdomeen, oligomerisatsiooni vahendav ja ATPasse aktiivsusega NOD domeen ning N-terminaalne CARD (*caspase-recruitment domain*) domeen (Boudreau *et al.*, 2012). Nod1 tajub keskkonnas ära *m*-DAP sisaldavaid muropeptiide ning Nod2 tunneb ära muramüül dipeptiide. Peale muropeptiidide detekteerimist keskkonnas, Nod1 ja Nod2 aktiveeruvad ning nende kaudu kutsutakse organismis esile immuunvastus ja hakatakse tootma tsütokiine (Dworkin, 2014).

### 1.3.2. Muropeptiid signaalina bakterites ja bakterite vahel

#### 1.3.2.1. Antibiootikumide resistentsuse induksioon

Mõnedel gram-negatiivsetel bakteritel on olemas mehhanism, mille kaudu muropeptiidid indutseerivad bakteris  $\beta$ -laktamaasi tootmist.  $\beta$ -laktamaas on ensüüm, mis hüdrolyüsib  $\beta$ -laktaami rõngast ning seeläbi muudab ta antibiootikumi  $\beta$ -laktaami inaktiivseks. Selliseks mehhanismiks, mille kaudu muropeptiidid indutseerivad  $\beta$ -laktamaasi sünteesi, on läbi AmpG-AmpR-AmpC raja.  $\beta$ -laktaamsete antibiootikumide mõjul vabaneb suurel hulgal GlcNAc-anhüdro-MurNAc-oligopeptiidide rakukesta koosseisust periplasmasse, kust nad transporditakse edasi AmpG transporterite kaudu tsütoplasmasse. Ensüüm NagZ eemaldab GlcNAc-anhüdro-MurNAc-oligopeptiididest suhkrujäägi GlcNAc, mille tulemusena hakkab tsütoplasmas akumuleeruma anhüdro-MurNAc-oligopeptiidid. Need muropeptiidid interakteeruvad LysR tüüpi transkriptsioonilise regulaatoriga AmpR (Zeng & Lin, 2013). AmpR on bakteris  $\beta$ -laktamaasi (AmpC) kodeeriva geeni aktivaator (Lindquist *et al.*, 1989). Tavaliselt on AmpR seotud UDP-MurNAc-pentapeptiidiga ning nii on AmpR-i aktiivsus maha surutud. Kui aga tsütoplasmas anhüdro-MurNAc-tripeptiidide kontsentratsioon tõuseb, asendavad nad AmpR-i koosseisus UDP-MurNAc-pentapeptiidi. AmpR-i konformatsioon muutub, ta muutub aktiivseks ning indutseerib transkriptsiooni geenilt *ampC* (Jacobs *et al.*, 1997). On olemas ka teisi mehhanisme, kuidas indutseeritakse  $\beta$ -laktaamide resistentsusgeenide ekspressiooni, kuid nende puhul pole täpselt teada, kas muropeptiidid on otseselt seotud nende mehhanismide aktiveerimisega (Zeng & Lin, 2013).

#### 1.3.2.2. Statsionaarsest seisundist väljumise reguleerimine

Bakterid võivad ebasoodsad elutingimused üle elada minnes soikeseisundisse. Soikeseisundis on bakter metaboolset inaktiivne, ta ei jagune ega kasva enam. Sellisesse seisundisse minekut võivad esile kutsuda mitmed põhjused, nagu näiteks toitainete puudumine, ekstreemsed temperatuuri ja rõhu muutused, liigne kuivus või ka antimikroobsete ühendite esinemine keskkonnas (Dworkin & Shah, 2010). Perekonna *Bacillus* esindajad moodustavad ebasoodsate elutingimuste üleelamiseks spore. Spoorid on väga vastupidavad erinevate stressifaktorite suhtes ning bakterid võivad spoorina eksisteerida sadu aastaid. Isegi kui bakter on soikeseisundis, peab ta pidevalt jälgima ümbritsevat keskkonda ning elutingimuste paranemisel käivitama soikeseisundist väljumise mehhanismid. Kui spoor on moodustunud toitainete puudumise või vähesuse tõttu keskkonnas, siis võib spoori idanemiseks olla signaaliks spetsiifilised toitainete molekulid. Need molekulid seonduvad spoori sisemisel



membraanil olevate retseptoritega ning käivitatakse spoori idanemine. Spoori südamikust vabastatakse suurel hulgal kaltsiumiga seotud dipikoliinhapet (Ca-DPA) ning rakku hakkab läbi akvaporiniinide vesi sisse liikuma. Vee sissevooluga aktiveeritakse ensüümid, mis hakkavad lüüsima spoori südamikku ümbritsevat peptidoglükaanist korteksit. Korteksi hüdrolüüsimisel hakkab spoori südamik paisuma ning veelgi rohkem vett liigub rakku sisse. Vee osakaalu suurenemine võimaldab ensüümide aktiveerimist, makromolekulide sünteesi ja metabolismi käivitamist, kuni lõpuks rakk on võimeline jälle kasvama ja paljunema (Setlow, 2008). On leitud, et ka muropeptiidid võivad juba väga väikeste kontsentratsioonide juures ( $\leq 1$  pg/ml) indutseerida spooride idanemist. *Bacillus subtilis*'e spooridel on olemas membraanseoseline Ser/Thr kinaas (PrkC), mille ekstratsellulaarses domeenis on PASTA (penitsilliini ja Ser/Thr kinaasiga seotud) kordused. Need kordused on vajalikud peptidoglükaani fragmentide ära tundmiseks ja sidumiseks. Kui muropeptiidid seonduvad PrkC-ga, siis viimane fosforüleerib olulise ribosomaalse GTPaasi EF-G (elongatsiooni faktor G) (Shah *et al.*, 2008). EF-G osaleb mRNA ja tRNA translokaliseerimisel ja ribosoomide taaskasutamisel ning seeläbi on tal oluline roll ka translatsiooni stimuleerimisel spoori idanemisel (Shah & Dworkin, 2010). Soikeseisundis olevad spoorid sisaldavad spetsiifilisi mRNA-sid, mida aktiivselt kasvavas ja jagunevas rakus enam ei leidu. Seega translatsiooni taaskäivitamine võib olla esimene biosünteesiline samm spoori transformatsioonil metaboolselt aktiivseks rakuks. Siiski on ebatõenäoline, et EF-G fosforüleerimise kaudu translatsiooni käivitamine on tähtsaim mehhanism spoori soikeseisundist väljumisel (Shah *et al.*, 2008). Hiljuti on leitud, et PrkC on võimeline reguleerima WalRK kahekomponendilist signaalsüsteemi. WalRK koosneb sensor kinaasist WalK ja vastuse regulaatorist WalR. WalK autofosforüleerub ja annab fosfaatrühma edasi regulaatorvalgule WalR, mis aktiveerib või inhibeerib mitmete geenide ekspressiooni. Geenid, mille ekspressiooni antud signaalsüsteemiga reguleeritakse, on kõik seotud peptidoglükaani metaboliseerimisega. Konserveerunud WalRK regulonis olevate geenide hulka kuuluvad mitmed peptidoglükaani hüdrolaase kodeerivad geenid. Peale WalK võib WalR-i fosforüleerida ka PrkC. Kõige enam mõjutab PrkC WalR reguloni ekspressiooni just kasvu aeglustumisel statsionaarses faasis, kuna selles faasis hakkab sensorkinaasi WalK aktiivsus langema (Libby *et al.*, 2015). Võimalik, et selle signaalsüsteemi kaudu modifitseeritakse rakukesta nii, et vee osakaal spooris saab suurenda ja seeläbi käivitatakse soikeseisundist väljumine väljumisel (Shah *et al.*, 2008).

Mittesporuleerivatel bakteritel on teised mehhanismid ebasoodsate elutingimuste üleelamiseks. Nad võivad jääda VBNC (*viable but nonculturable*) seisundisse või elada stressitingimused

üle persisteritena (Dworkin & Shah, 2010). VBNC seisundis olevad bakterid on küll elus, kuid nad ei kasva ega suuda moodustada uusi kolooniaid ning nende metaboolne aktiivsus on väga madal (Oliver, 2005). Persisteriteks nimetatakse selliseid baktereid, kes on tolerantset mitmete antibiootikumide suhtes. See tolerantus on tekkinud tänu sellele, et sellised bakterid ei kasva ega jagune, mistõttu rakuseina sünteesi või ka translatsiooni ei toimu. Kuna mitme antibiootikumi toimemehhanismiks on rakuseina sünteesi, transkriptsiooni, replikatsiooni või translatsiooni inhibeerimine, siis need antibiootikumid ei saa enam avaldada mõju bakteritele, kus need protsessid on juba eelnevalt inhibeeritud raku enda poolt. Antibiootikumid on kaotanud oma sihtmärgi. Võrreldes VBNC seisundis olevate bakteritega, moodustavad persisterid ainult väikese fraktsiooni kogu populatsioonist (Dworkin & Shah, 2010) ning kui elutingimused paranevad, muutub ainult osa persisteritest aktiivselt kasvavateks rakkudeks. Ülejäänud jäävad siiski persisteritena populatsioonis püsima (Balaban *et al.*, 2004). Üheks selliseks mittesporuleerivaks bakteriks on *Micrococcus luteus*, kes elutingimuste halvenedes jääb sellisesse olekusse, kus tema metaboolne aktiivsus on vähenenud ning ta ei kasva ega jagune enam (Mukamolova *et al.*, 2006). 1998. aastal leiti, et peale soikeseisundist väljumist hakkavad aktiivselt kasvavad ja jagunevad *Micrococcus luteus*'e rakud sekreteerima väliskeskkonda rpf (*resuscitation-promoting factor*) molekule, mis võivad juba pikomolaarsetes kogustes indutseerida ülejäänud läheduses olevate bakterite väljumist soikeseisundist (Mukamolova *et al.*, 1998). Hiljem on leitud, et rpf-sarnaseid molekule sekreteerivad ka mitmed teised gram-positiivsed G+C rikkad mittesporuleeruvad aktinomütsetide hõimkonda kuuluvad bakterid (Nikitushkin *et al.*, 2016). Rpf molekulid on ensüümid, mis hüdrolyüsivad rakukesta ja nii vabastatakse rakukesta koosseisust muropeptiide (Mukamolova *et al.*, 2006; Nikitushkin *et al.*, 2013). Hetkel ei ole veel täpselt selge, kuidas rpf indutseerib soikeseisundist väljumist. Kuna aktiivselt kasvavas ja jagunevas rakus toimub üheaegselt nii rakuseina lagundamine ja süntees, siis rpf-i peptidoglükaani hüdrolyüsiv toime võib soikeseisundis olevas bakteris indutseerida rakuseina biosünteesi ja seeläbi ka raku kasvamise hakkamise. Teise hüpoteesi kohaselt on rpf valgu vahendatud rakuseina hüdrolyüsil vabanenud muropeptiidid signaaliks soikeseisundist väljumisel. Seda hüpoteesi toetab fakt, et näiteks rpf-i sekreteerival bakteril *Mycobacterium tuberculosis* on olemas sarnaselt *Bacillus subtilis*'ele membraanseoseline Ser/Thr kinaas (PknB). Sellel kinaasil on samuti olemas PASTA domeenid, mis on võimelised ära tundma muropeptiide (Nikitushkin *et al.*, 2016). PknB kinaasi ekspresseeritakse kõrgel tasemel eksponentsiaalse kasvu ajal ning tal on roll bakteri aktiivse kasvu ja jagunemise reguleerimisel ning raku kuju määramisel (Hett & Rubin, 2008). PknB tunneb ära just kasvavaid peptidoglükaaniahelaid

ning tänu sellele saab ta infot selle kohta, kus täpsemalt toimub rakuseina juurdekasv ja kuhu on vaja suunata uusi muropeptiide. Võimalik, et PknB reageerib ka rpf-i poolt vabastatud muropeptiididele ja käivitab rakus protsessid, mis on vajalikud soikeseisundist väljumiseks (Nikitushkin *et al.*, 2016). Lisaks on näidatud, et muropeptiidid tõepoolest indutseerivad bakterites *Mycobacterium smegmatis* ja *Mycobacterium tuberculosis* soikeseisundist väljumist, kuid antud katsetes ei näidatud, et just rpf-i poolt vabastatud muropeptiidid indutseerivad bakterite ärkamist (Nikitushkin *et al.*, 2013).

*Escherichia coli* on samuti mittesporuleeruv bakter, kes võib ebasoodsad elutingimused üle elada persisteritena (Jõers *et al.*, 2010) või VBNC seisundisse jäädes (Signoretto *et al.*, 2002). Võimalik, et tegemist ühe ja sama metaboolse seisundiga, mis on defineeritud erinevalt. Hiljuti on meie laboris avastatud, et muropeptiidid indutseerivad ka *Escherichia coli*'s soikeseisundist väljumist (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Kui baktereid kasvavad statsionaarsesse faasi, siis toitainete ammenduses nende kasv peatub, metaboolne aktiivsus väheneb oluliselt ning nad jäävad soikeseisundisse (Bacun-Družina *et al.*, 2011). Kui statsionaarses faasis olevad bakterid viidi üle värskesse söötmesse ja neile lisati erinevates kontsentratsioonides muropeptiide, oli näha, et muropeptiidide juuresolekul toimub soikeseisundist väljumine kiiremini kui kontrollsöötmes, kuhu ei oldud lisatud muropeptiide. Samuti leiti, et ärkamiskiirus on muropeptiidide kontsentratsioonist sõltuv. Mida suurem muropeptiidide kontsentratsioon, seda kiirem on väljumine soikeseisundist (Arvi Jõers, avaldamata andmed).

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Varasemalt on leitud, et *E.coli* tüvi K-12 BW25113 on võimeline reageerima muropeptiididele ning sellest sõltuvalt kiiremini väljuma statsionaarsest faasist ja muutuma metaboolset aktiivseks jagunevaks rakuks (Arvi Jõers, avaldamata andmed). Seda, kuidas bakter tunneb ära muropeptiide keskkonnast ja millise mehhanismi kaudu muropeptiidid indutseerivad kiiremat väljumist statsionaarsest faasist, ei ole veel teada.

Käesoleva töö eesmärk oli identifitseerida geenid, mis on seotud muropeptiididest sõltuva statsionaarsest faasist väljumisega.

## 2.2. Materjalid ja metoodika

### 2.2.1 Kasutatud bakteritüved, söötmed, praimerid, puhvrid

**Tabel 1.** Eksperimentides kasutatud *E.coli* tüved

Tüvi	Genotüüp	Allikas
K-12 BW25113	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔcpxA</i> (Keio kollektsioon)	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔcpxA</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔompF</i> (Keio kollektsioon)	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔompF</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔcpxR</i> (Keio kollektsioon)	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔcpxR</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔcpxP</i> (Keio kollektsioon)	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1 ΔcpxP</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006

Suuremas mahus kasvatati baktereid MOPS minimaalsöötmetes (Neidhardt *et al.*, 1974), mis sisaldasid süsinikuallikana 0,1% või 0,2% glütserooli (Gly) või 0,1% glükonaati (Glt). Skriiningu läbinud kultuur pandi üleööks kasvama LB tardsöötmetega tassidele. Glütserooli säilituskultuurist võetud baktereid kasvatati kõigepealt LB söötmes, enne kui nad külvati edasi MOPS söötmesse. Selekteerimiseks lisati söötmetesse kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 25 µl/ml. Dihüdrofolaadi reduktaasi (DHFR) kodeerivat geeni sisaldavates bakterites oli olemas ka plasmiid, mis sisaldas klooramfenikooli resistentsusgeeni. Selliste bakterite selekteerimiseks lisati söötmesse lisaks kanamütsiinile ka klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga 50 µl/ml. Skriiningu ajal antibiootikumitöötluse etapi läbiviimiseks lisati kultuurile ampitsilliini kontsentratsiooniga 100 µg/ml.

Baktereid kasvatati temperatuuril 37 °C Sanyo loksutitel kiirusel 220 rpm. Bakterikultuuri optilise tiheduse mõõtmiseks lainepikkusel 600 nm erinevatel ajahetkedel kasvatati baktereid

samuti 37 °C juures, kuid kasv toimus 96-kannuga plaatidel BioTek Synergy™ Mx mikrotiiterplaadilugejas.

**Tabel 2.** PCR reaktsioonides kasutatud praimerid

<b>Praimeri nimi</b>	<b>5'→ 3' järjestus</b>
EZTnExt	TTGGTTGTAACACTGGCAGAGC
EZTnInt	AAGCTCTCATCAACCGTGGCGG
DHFR FP-1	GGCGGAAACATTGGATGCGG
DHFR FPint	TCTAGAGTCGACCTGCAG
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

**Tabel 3.** Eksperimentides kasutatud puhvrid

<b>Puhvri nimi</b>	<b>Koostis</b>
12,5 mM naatriumfosfaatpuhver	1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; 11,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O; pH 5.8
1x TAE puhver	40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8,0

### 2.2.2 Peptidoglükaani puhastamine ja muropeptiidide preparaadi valmistamine

Bakteritüvi (K-12 BW25112) pandi üleööks kasvama 3 ml MOPS Gly 0,2% söötmesse. Järgmine päev pandi kahte kolbi 50 ml MOPS Gly 0,2% söödet ning mõlemaid inokuleeriti 1 ml üleöö kultuuriga. Baktereid kasvatati söötmes kuni OD (lainepikkusel 600 nm) oli ligikaudu 1,5. Baktereid tsentrifuugiti 15 minutit 5000 g juures tsentrifuugis Sigma 4K15C rootoriga 13350/11150. Supernatant valati ära, bakterid võeti üles 10 ml deioniseeritud vees, viidi kokku ühte tuubi ning lisati vett kuni 50 ml-ni. Baktereid tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel, supernatant eemaldati ja bakterid võeti üles 15 ml-s deioniseeritud vees. Peale kolmandat tsentrifuugimist samadel tingimustel võeti bakterid üles deioniseeritud vees nii, et koguruumala oli 2,4 ml ning jäeti üleöö seisma +4 °C juurde. Kolmandal päeval lisati bakteritele 1,6 ml 10% SDS-i (naatriumdodetsüülsulfaati). Seejärel keedeti segu 30 minutit 100 kraadi juures vesivannis ning jäeti üleöö toatemperatuurile. Neljandal päeval keedeti segu veel 10 minutit ning jagati siis kahte 2 ml Eppendorfi tuubi. Seejärel pesti segus olevaid peptidoglükaane veega, et eemaldada SDS. Selleks fuugiti segu 15 minutit 13 500 g juures

tsentrifuugis ScanSpeed mini rootoriga GRF-m2.0-12. Supernatant eemaldati, sade võeti üles 2 ml deioniseeritud vees ning viidi läbi uus tsentrifuugimine. Selliseid pesemise etappe tehti 5 korda. Viimased 3 pesu tehti deioniseeritud vee asemel 12,5 mM naatriumfosfaadipuhvril. Peale viimast pesemist suspendeeriti mõlemas Eppendorfi tuubis sade 450 µl-s naatriumfosfaadipuhvril.

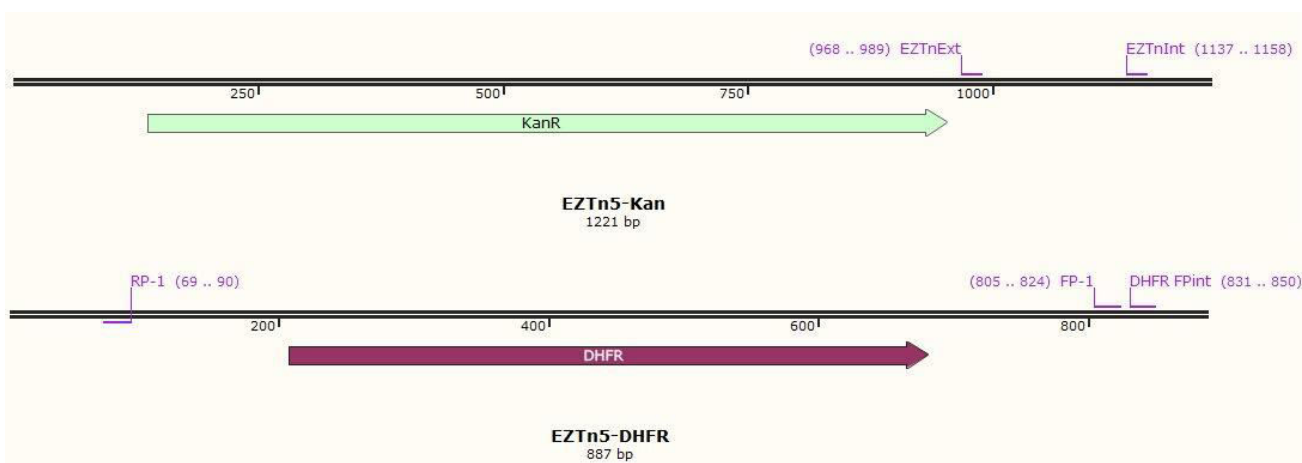
Saadud suspensioon sisaldas peamiselt peptidoglükaane. Muropeptiidide saamiseks oli vaja peptidoglükaane ensümaatilisel töödelda. Selleks lisati ühele peptidoglükaani sisaldavale segule 200 µl-s naatriumfosfaadipuhvril lahustatud mutanolüsiini ( $\geq 4000$  ühikut/mg, *Sigma-Aldrich*). Teine segu jäi ensüümtöötluseta ja kasutati kontrollina. Peale ensüümtöötlust inaktiveeriti ensüüm, hoides reaktsioonisegu 20 minutit temperatuuril 80 °C Biosan CH-100 termostaadil.

### 2.2.3 Plaadikatse lahjendusreaga

Täpne muropeptiidide kontsentratsioon saadud preparaadis ei ole teada ning erinevad eelkirjeldatud meetodil valmistatud preparaadid võivad sisaldada erineval hulgal muropeptiide. Et umbkaudu teada saada, kui palju on vaja muropeptiidide preparaati kasutada bakterite kiiremaks väljutamiseks statsionaarsest faasist, tuli teha muropeptiidide lahjendusreaga plaadikatse. Selleks kasvatati K-12 BW25113 tüve baktereid 4 päeva 5 ml MOPS Gly 0,1% söötmes. Baktereid tsentrifuugiti 15 minutit 5000 g juures tsentrifuugis Sigma 4K15C rootoriga 13350/11150. Supernatant eemaldati ning bakterid suspendeeriti 10 ml värskes MOPS Gly 0,1% söötmes. Seejärel võeti 96-kannuga mikrotiiterplaat, mille äärtes olevatesse kannudesse lisati 200 µl vett. Mikrotiiterplaadil testiti erinevaid muropeptiidide kontsentratsioone. Kannudesse lisati 100 µl statsionaarsete bakterite suspensiooni ja igasse kannu lisati erinevates kontsentratsioonides muropeptiidi preparaate. Negatiivse kontrollina ei lisatud söötmesse midagi ning positiivse kontrollina lisati söötmesse 3 µl *Bacillus subtilis*'est pärit muropeptiide. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti kultuuri OD-e muutuse vaatlemisega ajas lainepikkusel 600 nm BioTek Synergy™ Mx mikrotiiterplaadilugejas. Kui statsionaarse faasi rakud muutuvad uuesti metaboolselt aktiivseks, siis nad suurenevad mõõtmel mõnevõrra ja hakkavad jagunema. Kui rakkude hulk suureneb kultuuris, suureneb ka kultuuri optiline tihedus. Seega saab optilise tiheduse jälgimisega ajas määrata, millal on bakterid statsionaarsest faasist väljunud ja hakanud uuesti aktiivselt jagunema.

## 2.2.4 Statsionaarsest faasist väljumisel muropeptiidele mittereageerivate bakterite skriining

Skriinimisel kasutati kahte erinevat transposoonmutageneesiga loodud *E.coli* tüve K-12 BW25113 bakterite raamatukogu. Esimeses raamatukogus olevad bakterid sisaldasid pETgfpAGGAGG(3) plasmidi ning selle raamatukogu loomisel kasutati EZ-Tn5<sup>TM</sup> <DHFR-1>Tnp Transposome<sup>TM</sup> Kit-i (*Epicentre Biotechnologies*). Raamatukogu loomisel inserteerusid DHFR resistentsusgeeniga EZ-Tn5 transposoonid (joonis 4) juhuslikesse kohtadesse bakteri genoomis ning nii loodi terve hulk erinevaid bakteri kloone, kus transposooniga oli katkestatud juhuslikud geenid. Keskmiselt katkestas üks transposoon ühe geeni ainult ühes rakus. Teises raamatukogus olevad bakterid ei sisaldanud plasmide ning raamatukogu konstrueeriti kasutades EZ-Tn5<sup>TM</sup><KAN-2>Tnp Transposome<sup>TM</sup> Kit-i (*Epicentre Biotechnologies*), milles transposoonid sisaldasid selekteerimiseks vajalikku kanamütsiini kodeerivat geeni (joonis 4). Esimese raamatukogu tegi Arvi Jõers ja teise Vallo Varik TÜ tehnoloogiainstituudist Tanel Tensoni grupist.



**Joonis 4. Transposoonraamatukogude konstrueerimisel kasutatud transposoonid.** Kanamütsiini resistentsusgeeniga transposoon sisaldas praimerite EZTnExt ja EZTnInt seondumissaite ning dihidrofolaaadi reduktaasi kodeeriva geeniga transposoon sisaldas praimerite DHFR FP-1 ja DHFR FPint seondumissaite.

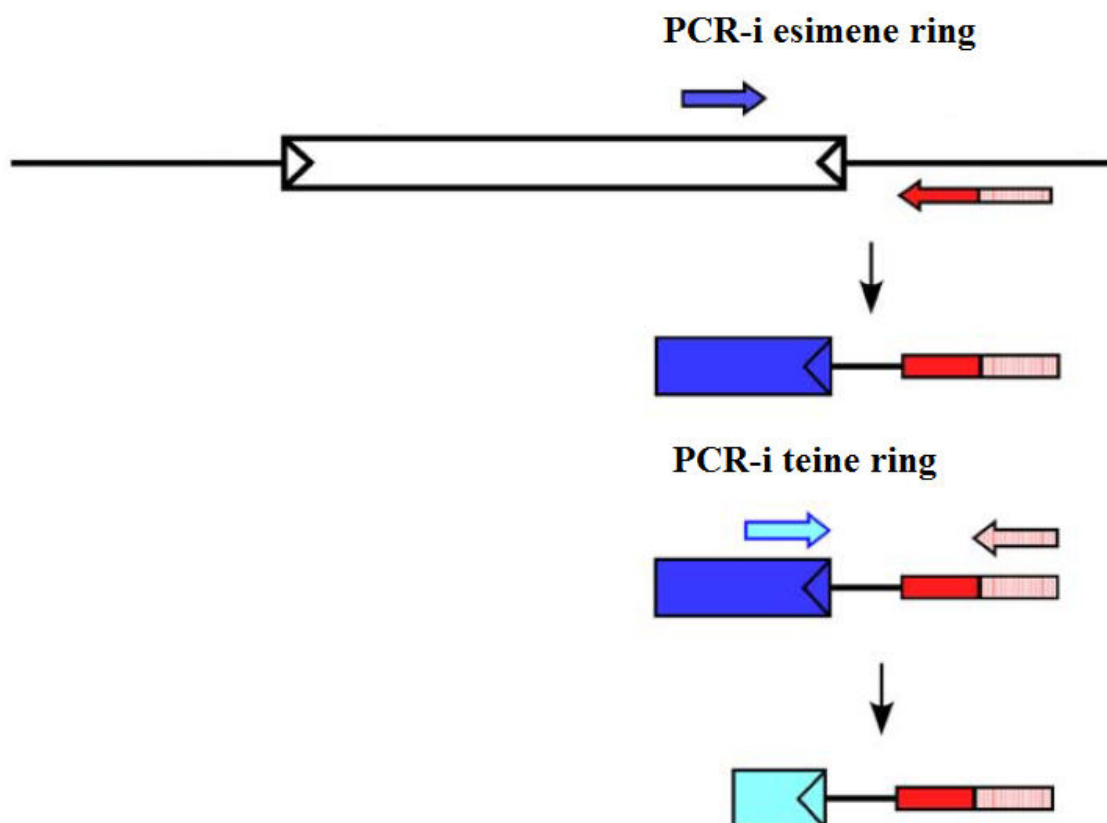
Skriiningu eesmärk oli läbi selektsiooni suurendada nende bakterite hulka kultuuris, milles oli transposooniga katkestatud sellised geenid, mis on olulised muropeptiidide äratundmiseks ja sellest sõltuvalt kiiremaks statsionaarsest faasist väljumiseks. Raamatukogud olid olemas glütserooli säilituskultuuridena. Sealt võeti baktereid ja pandi LB söötmetesse kasvama, kuni OD 600 nm juures oli vahemikus 0,5-0,7. LB kultuuridest tehti 1/1000 lahjendused MOPS Gly 0,1% söötmetesse ja baktereid kasvatati nendes söötmetes 4 päeva. Peale seda viidi 1 ml kultuuri 15 ml-sse tuubi ja baktereid fuugiti 10 minutit 5000 g juures tsentrifuugis Sigma



4K15C rootoriga 13350/11150. Supernatant valati ära, rakud võeti üles 2 ml värskes MOPS Gly 0,1% söötmes, kuhu oli lisatud 40 µl muropeptiidide preparaati. Suspensioon viidi tuubidest üle kolvidesse ja bakteritel lasti kasvada 4 tundi. Peale seda tehti ampitsilliinitöötlus. Selleks lisati kultuurile ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml ja lasti sellel mõjuda tund aega, samal ajal kui bakterid loksutil olid. Peale antibiootikumitöötlust bakterid tsentrifuugiti 10 minutit 5000 g juures tsentrifuugis Sigma 4K15C rootoriga 13350/11150, supernatant valati ära ja rakud suspendeeriti 10 ml värskes MOPS Gly 0,1% söötmes. Baktereid kasvatati jälle 4 päeva MOPS Gly 0,1% söötmes ja ring algas otsast peale. Selliseid skriiningu etappe tehti kokku 4 korda.

### **2.2.5 Arb-PCR**

Arb-PCR-i kasutati EZ-Tn5 transposooni insertsioonikohtade tuvastamiseks transposoonraamatukogust pärit bakterite genoomis. Arb-PCR-iga amplifitseeriti DNA lõike, mis sisaldasid transposooni otsapoolset järjestust ja transposooniga külgnevat bakteri genoomset järjestust (joonis 5).



**Joonis 5. Ülevaade arb-PCR-ist.** Transposoon on joonisel kujutatud ristkülikuna, mille otstes on kolmnurgad. Esimeses ringis PCR-is kasutatakse kahte praimerit. Ühe praimer seondumissait on transposooni sees (tumesinine nool). Teine praimer on semidegeneratiivne (punane/roosa nool). Praimeri 5' ots on spetsiifilise järjestusega ning 3' ots on sellise järjestusega, mis lubab praimeril seonduda erinevatesse piirkondadesse bakteri genoomis. Esimesest PCR-i reaktsioonist saadudprodukte kasutatakse matriitsina teise ringi PCR-is. Teise ringi PCR on vajalik selleks, et kindlustada, et amplifitseeritavad DNA lõigud on pärit transposooni kõrvalt. Teisel ringil kasutatakse kahte uut praimerit. Üks praimer seondub transposooni otsa järjestusele (helesinine nool), teine praimer on identne esimeses tiirus kasutatud semispetsiifilise praimer 5' järjestusega ja seondub matriitsi otsjärjestusega (roosa nool). Arb-PCR-i tulemusena saadakse DNA lõigud, mis sisaldavad osaliselt transposooni järjestust ja osaliselt bakteri genoomset järjestust (Das *et al.*, 2005, kohandatud).

Antud katses amplifitseeriti DNA lõike ainult ühelt poolt transposooni. PCR-i reaktsioonisegu lõppmaht oli 20 µl. Segu sisaldas 0,2 mM dNTP-e, 1x B puhvrit (*Solis BioDyne*), 0,5 µM transposooni järjestusega seonduvat praimerit, 0,5 µM bakteri genoomse järjestusega seonduvat praimerit, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5U Taq polümeraasi (*Solis BioDyne*), baktereid ja ülejäänud mahus Milli-Q vett.

Esimeses PCR-i tiirus lisati reaktsioonisegule praimerid EZTnExt ja CEKG2C juhul, kui segus olevad bakterid olid pärit kanamütsiini resistentsusgeeniga transposoonraamatukogust.

Reaktsioonisegusse lisati praimerid FP-1 ja CEKG2C juhul, kui PCR-i segus olevad bakterid olid pärit plasmiidiga bakteritega loodud transposoonraamatukogust.

Esimese ringi PCR koosnes kahest etapist ja see viidi läbi järgmistel tingimustel

- I. Esimene etapp: *touch down* PCR, kokku 5 tsüklit
  1. DNA denaturatsioon 95 °C 30 sekundit
  2. Praimeri seondumine matriitsile 44 °C kuni 36 °C 30 sekundit (esimeses tsükli oli temperatuur 44 °C ja viimases tsükli 36 °C, iga tsükliga alandati temperatuuri 2 °C võrra)
  3. DNA süntees 72 °C 90 sekundit
- II. Teine etapp: kokku 30 tsüklit
  1. DNA denaturatsioon 95 °C 30 sekundit
  2. Praimeri seondumine matriitsile 44 °C 30 sekundit
  3. DNA süntees 72 °C 2 minutit

*Touch down* PCR-i etapis muudeti praimer seondumise faasis temperatuur järjest madalamaks selleks, et semidegeneratiivne praimer kindlasti seonduks erinevatesse kohtadesse bakteri genoomses DNA-s. Madalamatel temperatuuridel praimerite seondumisspetsiifilisus väheneb ja DNA järjestuses on rohkem kohti, kuhu ta võib seonduda.

Teise ringi PCR-is kasutati kanamütsiini resistentsusgeeniga rakkude puhul primereid EZTnInt ja CEKG4 ning plasmiidiga rakkude puhul primereid FP-int ja CEKG4.

Teise ringi PCR koosnes 30 tsüklist ja see viidi läbi järgmistel tingimustel

1. DNA denaturatsioon 95 °C 30 sekundit
2. Praimeri seondumine matriitsile 54 °C või 60 °C 30 sekundit (kui reaktsioonisegusse lisati praimerid EZTnInt ja CEKG4, siis oli temperatuur 60 °C, ning praimerite FP-int ja CEKG4 puhul oli temperatuur 54 °C)
3. DNA süntees 72 °C 2 minutit

### 2.2.6 Geelektroforees

PCR-i produkte analüüsi geelektroforeesil. Selleks valmistati 1,2% agarosgeel, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Geel asetati foreesivanni ning sinna valati 1xTAE puhvrit. Proovidele lisati 3 µl foreesivärvi (*DNA Gel Loading Dye 6X, ThermoFisher Scientific*) ja segud kanti agarosgeelile. PCR-i produktides olevate DNA fragmentide umbkaudseks suuruse määramiseks kanti geelile ka DNA markerit (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ThermoFisher Scientific*). Geelektroforees toimus 40 minutit pingel 95 volti. Hiljem visualiseeriti DNA fragmendid UV valguses.

### 2.2.7 DNA puhastamine geelist ja sekveneerimine

DNA puhastamiseks geelist kasutati *GEL/PCR Purification Mini Kit'i (Favorgen)* ja *Smarter Nucleic Acid Sample Preparation kit'i (Strattec)*.

DNA fragmentide sekveneerimiseks kasutati Eesti Biokeskuse tuumiklabori teenust. Tuumiklaboris kasutatakse sekveneerimise läbiviimiseks firma Applied Biosystems kapillaarsekvenaatoreid (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer ja Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer).

## 2.3. Tulemused

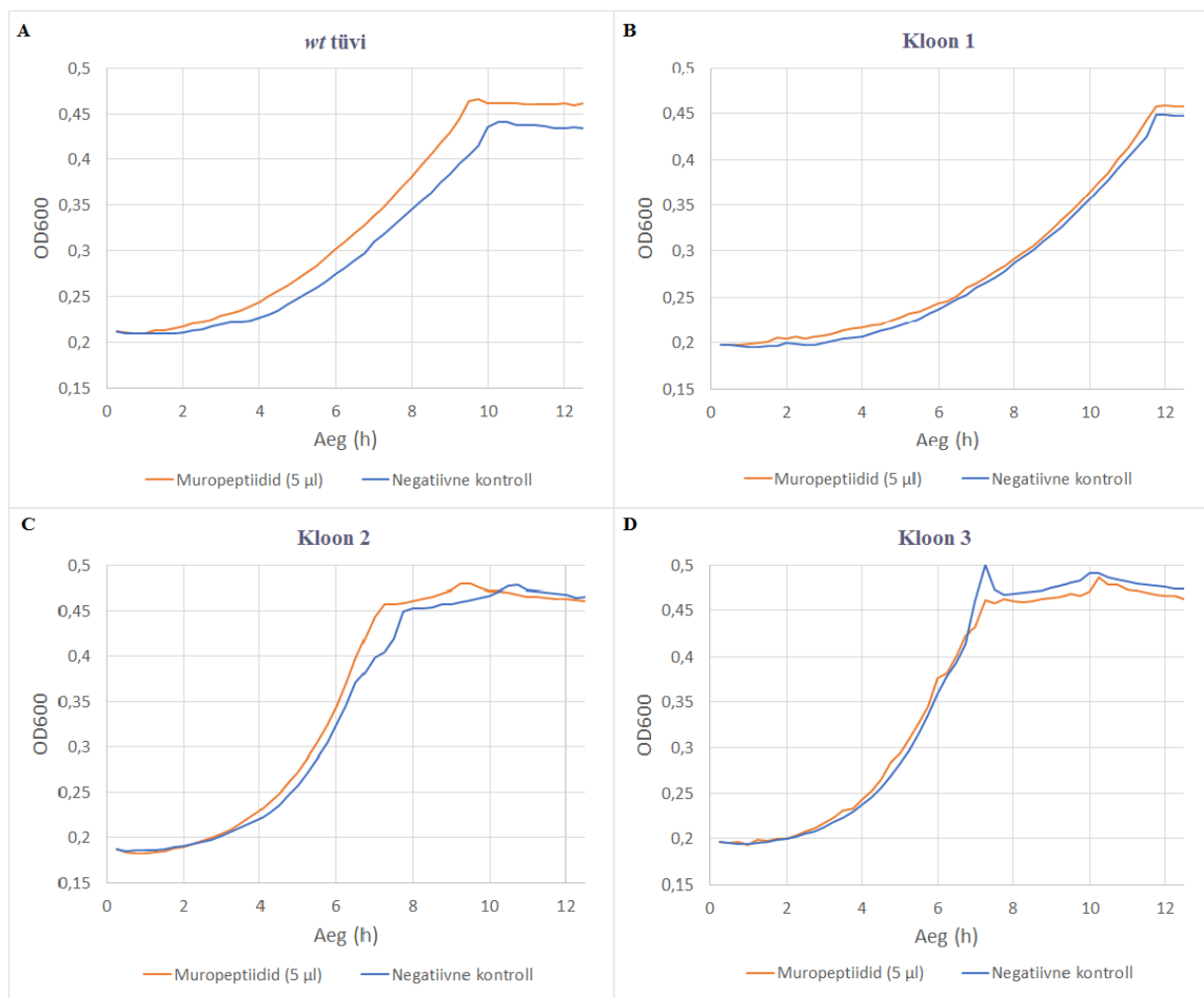
### 2.3.1 MP mittereageerivad mutandid transposooni raamatukogust

Enne skriinimist tehti ärkamiskatse, et leida optimaalne aeg ampitsilliintöötuse tegemiseks. Selleks kasvatati baktereid 4 päeva MOPS Gly 0,1% söötmes, mille järel viidi bakterid uuesti värskesse söötmesse ning suspensioon jagati kahe katseklaasi vahel. Ühte katseklaasi lisati muropeptiide, teise peptidoglükaane. Iga tunni aja tagant 8 tunni jooksul võeti osa kultuuridest välja ja mõõdeti kultuuride optilisi tihedusi. Nii saadi kaks erinevat kasvukõverat, kus võis näha, millal ärkasid bakterid muropeptiidide juuresolekul ja millal peptidoglükaanide juuresolekul. Ampitsilliinitöötuseks valiti aeg, millal muropeptiididega kultuuri OD oli hakanud tõusma, samal ajal kui peptidoglükaanidega kultuuri OD oli veel püsivalt madalal tasemel.

Skriinimisel kasvatati bakterid MOPS Gly 0,1% söötmes 4 päeva. Kui bakterid viia uuesti värskesse söötmesse, hakkavad ellujäänud bakterid taas kasvama ja jagunema. Muropeptiidide lisamisel söötmesse väljusid osad bakterid kiiremini statsionaarsest faasist kui ülejäänud. Võimalik, et osades hilisemates ärkajates oli transposoon katkestanud selliseid geene, mis on vajalikud muropeptiidide äratundmiseks ja sellest sõltuvalt kiiremaks kasvu ja jagunemise taasalustamiseks. Ampitsilliinitöötus tehti sellisel ajahetkel, kus muropeptiididele reageerivad bakterid olid juba alustanud statsionaarsest faasist väljumist, samal ajal kui muropeptiididele mittereageerivad bakterid olid eeldatavalt alles mittekasvavas olekus. Nii elimineeriti osad muropeptiididele reageerivad bakterid. Ampitsilliintöötusega ei suudetud elimineerida selliseid baktereid, mis võisid küll ära tunda muropeptiide, kuid kellel läks kauem aega oma metabolismi ümberkorraldamiseks ja aktiivselt jagunevaks rakuks muutumiseks. Sellised rakud elimineeriti siis, kui bakterid viidi uuesti värskesse söötmesse ning kasvatati jälle statsionaarsesse faasi. Selle perioodi jooksul oli eelis nendel rakkudel, kes ärkasid kiiremini üles. Kui liiga aeglaselt statsionaarsest faasist väljuvad rakud lõpuks üles ärkasid, moodustasid suurema osa kultuurist kiiremate ärkajate populatsioonid. Samuti oli enamus toitaineid kiiremate ärkajate poolt ära tarbitud ning seetõttu mitmed aeglasemad ärkajad ei saanud aluse panna oma populatsioonidele. Pärast mitut skriiningu etappi moodustasid eeldatavalt suurema osa kultuurist need bakterid, milles olid transposoonid katkestanud muropeptiididest sõltuva statsionaarsest faasist väljumiseks vajalikud geenid.

Uurimaks, kas skriining oli edukas, tuli teha plaadikatse muropeptiidide ja peptidoglükaanide juuresolekul ja vaadata, millised transposoonraamatukogust pärit kloonid ei reageeri

muropeptiidele statsionaarsest faasist väljumisel. Selleks külvati skriiningu läbinud kultuur LB agarplaadile. Järgmisel päeval valiti agarplaadilt juhuslikult 29 kolooniat (14 ühest ja 15 teisest raamatukogust). Nendega viidi läbi katse, kus testiti, kas muropeptiidid mõjutavad valitud kloonide statsionaarsest faasist väljumise kiirust või mitte. Katsete tulemusena leiti kolm kloon, mille puhul oli muropeptiidide mõju statsionaarsest faasist väljumise kiirusele palju väiksem võrreldes *wt* tüvega (joonis 6).

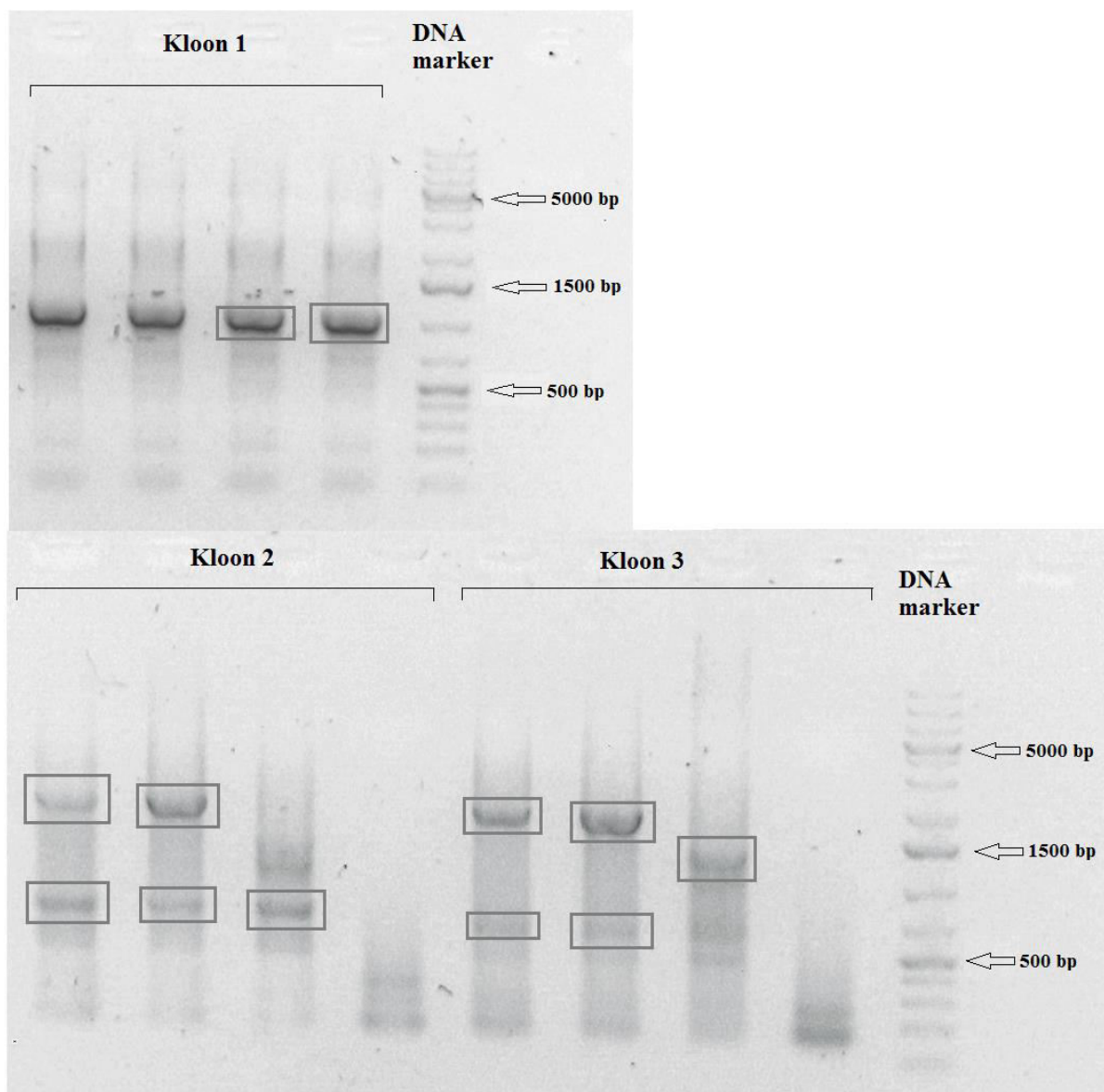


**Joonis 6. Skriiningu käigus leiti kolm kloon, millele muropeptiidid ei avaldanud nii suurt mõju nagu *wt* tüvele.** Skriiningu läbinud kultuurist valiti juhuslikud kloonid ja viidi läbi ärkamiskatse. Kasvusöötmele lisati muropeptiide (5 µl muropeptiidide preparaati 100 µl kultuuri kohta). Negatiivsele kontrollile ei lisatud söötmesse midagi. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures suurenemise järgi ajas.

### 2.3.2 Transposoonide insertioonide asukohad mutantsete kloonide genoomis

Arb-PCR-iga saadi DNA fragmendid, mis sisaldasid ühes otsas transposooni järjestust ja teises otsas kloni genoomset järjestust. Erinevate DNA fragmentide lahutamiseks viidi läbi geelelektroforees. Esimesel geelelektroforeesil oli DNA hägu geelis palju (see tähendab, et

PCR-iga saadi palju erineva suurusega DNA fragmente). Seetõttu lõigati DNA fragmentide rikkamad osad geelist välja, DNA puhastati geelist, viidi läbi uus arb-PCR (ainult teine arb-PCR-i ring) ja uus geelelektroforees. Lõpuks saadi 500 kuni 2000 aluspaarised DNA fragmendid (joonis 7), mis puhastati geelist ja viidi sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.



**Joonis 7. Geelelektroforeesil lahutatud DNA fragmendid.** Joonisel on kujutatud teistkordse geelelektroforeesi tulemusi. Kastiga on ümber tõmmatud nendele bändidele, mis lõigati geelist välja ja millest puhastati DNA fragmendid, mis viidi sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.

Sekveneerimistulemusi analüüsiti programmis SnapGene. Kuna transposoonide järjestus oli eelnevalt teada, sai täpselt määrata, kus lõppes transposooni järjestus ja kus algas genoomne järjestus. Referentsjärjestuseks võeti bakteri *E.coli* tüve BW25113 kogu genoomi järjestus

ning otsiti, milliste geenide järjestusse kuuluvad sekveneeritud PCR-i fragmentide genoomsed järjestused. Leiti, et kloonides 2 ja 3 oli transposoon katkestanud geeni *ompF*. Katkestus toimus samas geenis, kuid erinevates kohtades. Kloonis 1 oli transposoon inserteerunud geeni *cpxA*.

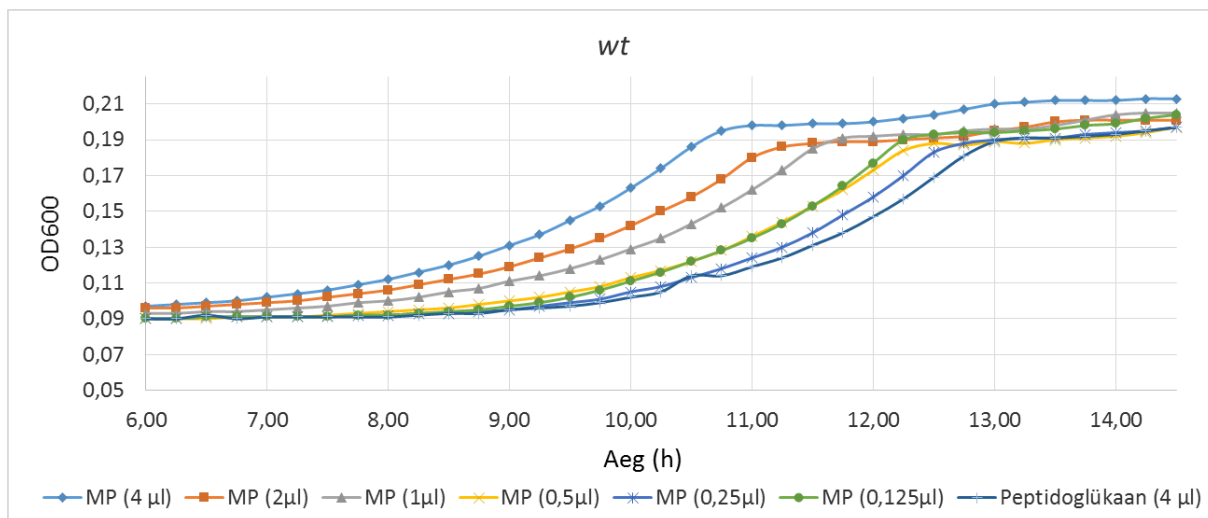
### 2.3.3 KEIO kolleksioonist pärit mutantide ärkamiskineetika

Keio kolleksioon on komplekt *E.coli* K-12 BW25113 tüve mutante, kus igas mutandis on üks mitteolulistest (*nonessentials*) geenidest deleteeritud (Baba *et al.*, 2006). KEIO kolleksioonist valiti välja mutandid, mille genoomist olid deleteeritud geenid *ompF* ja *cpxA*, ja nendega viidi läbi ärkamiskatse, kus sai näha antud geenide deleteerimise mõju ärkamiskineetikale erinevate muropeptiidide kontsentratsioonide juuresolekul. Ärkamiskatse erines algsest lahjendusreaga plaadikatses mitme tunnuse poolest. Esiteks oli mikrotiiterplaadil vahetult enne OD muutuse jälgimise algust igas kannus 2-kordse lahjenduse asemel 20-kordne bakterite suspensiooni lahjendus. Teiseks tehti süsinikallika vahetus. Baktereid kasvatati statsionaarsesse faasi 4 päeva MOPS Gly 0,1% söötmes, kuid peale tsentrifuugmist võeti rakud üles MOPS Glt 0,1% söötmes üles ning muropeptiidide lahjendusrida tehti samuti MOPS Glt 0,1% söötmesse. Suurema lahjenduse tegemine ja süsinikuallika vahetamine aeglustavad bakterite väljumist statsionaarsest faasist ning seetõttu on muropeptiidide efekt ärkamisel selgemini nähtav. Kolmandaks sisaldas kõige suurema muropeptiidide kontsentratsiooniga kann mitte 5 µl, vaid 4 µl muropeptiidide preparaati, ning iga järgnev kann sisaldas poole vähem muropeptiide kui talle eelnev kann.

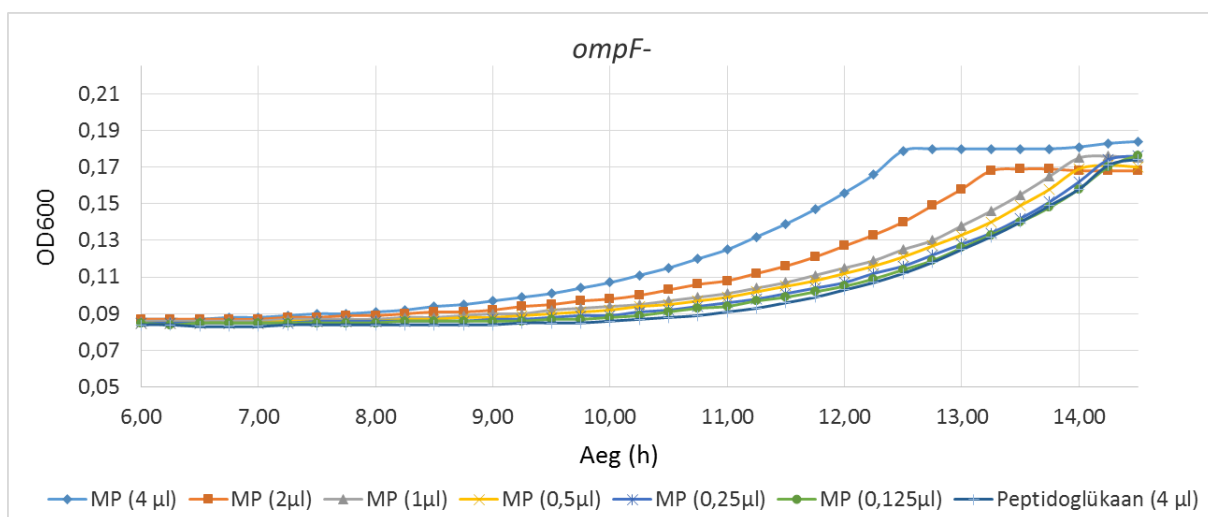
*Wt* tüves (joonis 8) väljusid bakterid statsionaarsest faasist erinevatel kiirustel, sõltuvalt sellest, kas söötmesse oli lisatud erinevates kontsentratsioonides muropeptiide või peptidoglükaane. Peptidoglükaani juuresolekul oli bakterite ärkamine aeglaseim ja mida kõrgem oli muropeptiidide kontsentratsioon kasvusöötmes, seda kiiremini väljusid bakterid statsionaarsest faasist. *ompF* mutandis (joonis 9) reageerisid bakterid muropeptiididele, kuid ainult siis, kui muropeptiide oli kasvusöötmes piisaval hulgal. Madalamad muropeptiidi kontsentratsioonid ( $\leq 1$  µl muropeptiidide preparaati 100 µl kultuuri kohta) *ompF* mutandile mõju ei avaldanud, samal ajal kui *wt* tüvel oli erinevus kontrollist veel detekteeritav. *cpxA* mutandil (joonis 10) oli ärkamiskineetika kohati sarnane *ompF* mutandi omaga - madalamad muropeptiidide kontsentratsioonid ( $\leq 1$  µl muropeptiidide preparaati 100 µl kultuuri kohta) ei avaldanud mõju statsionaarsest faasist väljumisele. Kõrgemad muropeptiidide kontsentratsioonid ( $\geq 2$  µl muropeptiidide preparaati 100 µl kultuuri kohta) suutsid kiirendada



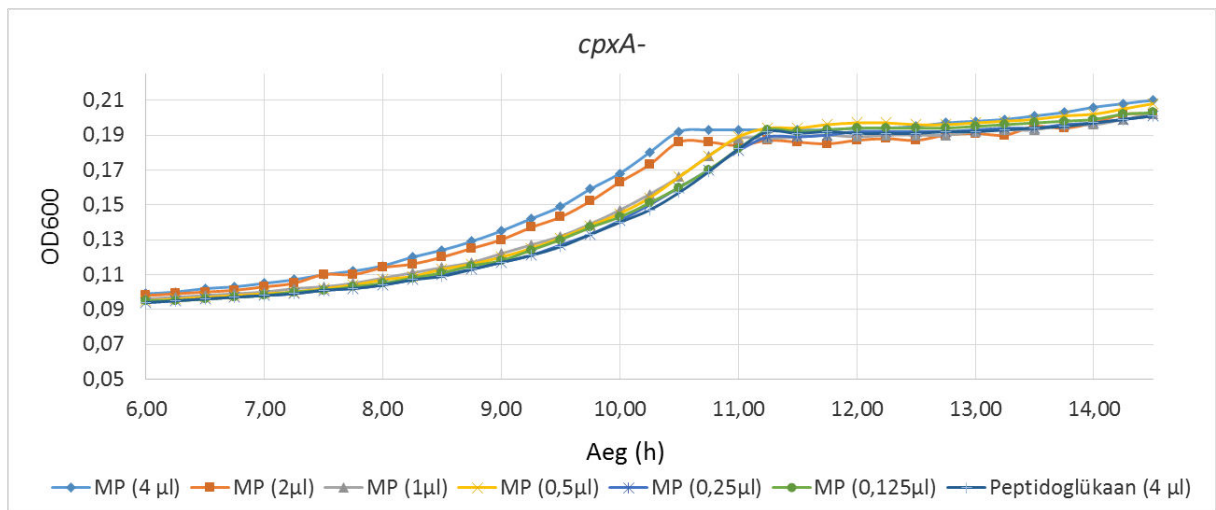
*cpxA* mutandi ärkamist. *cpxA* geeni deleteerimisel oli muropeptiidide mõju statsionaarsest faasist väljumisele vähenenud rohkem kui geeni *ompF* deleteerimisel.



**Joonis 8. *wt* tüve ärkamiskineetika erinevate muropeptiidide kontsentratsioonide ja peptidoglükaani juuresolekul.** Lühend MP tähendab muropeptide. Joonisel on toodud muropeptiidide ja peptidoglükaani preparaatide kontsentratsioonid 100 µl kultuuri kohta. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures suurenemise järgi ajas. Antud katset on korratud 3 korda. Joonisel on esitatud representatiivne tulemus.



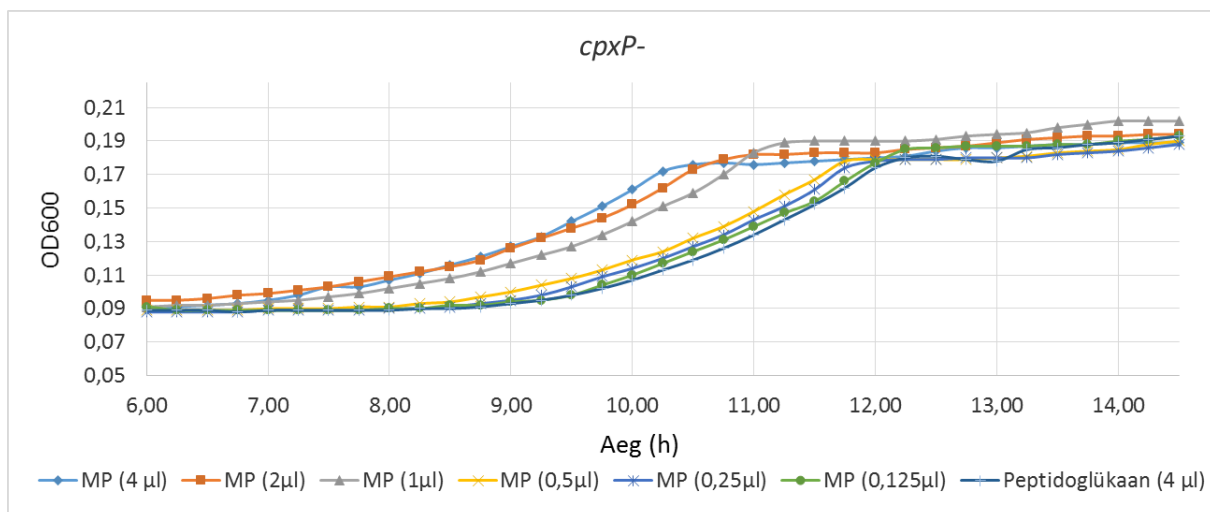
**Joonis 9. *ompF* mutandi ärkamiskineetika erinevate muropeptiidide kontsentratsioonide ja peptidoglükaani juuresolekul.** Lühend MP tähendab muropeptide. Joonisel on toodud muropeptiidide ja peptidoglükaani preparaatide kontsentratsioonid 100 µl kultuuri kohta. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures suurenemise järgi ajas. Antud katset on korratud 3 korda. Joonisel on esitatud representatiivne tulemus.



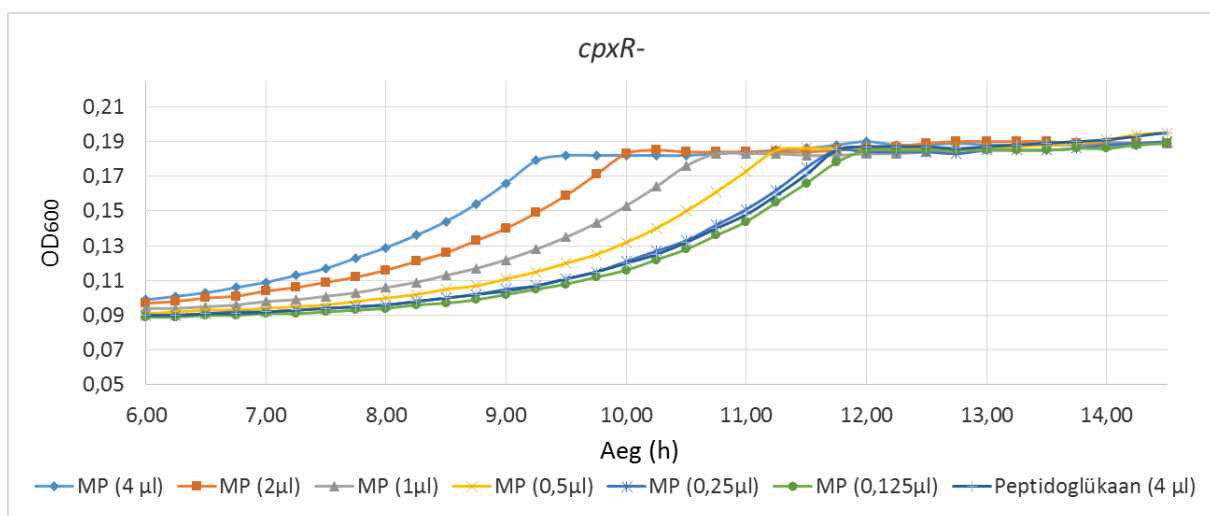
**Joonis 10. *cpxA* mutandi ärkamiskineetika erinevate muropeptiidide kontsentratsioonide ja peptidoglükaani juuresolekul.** Lühend MP tähendab muropeptiide. Joonisel on toodud muropeptiidide ja peptidoglükaani preparaate kontsentratsioonid 100 µl kultuuri kohta. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures suurenemise järgi ajas. Antud katset on korratud 3 korda. Joonisel on esitatud representatiivne tulemus.

### 2.3.4 CpxRA signaalsüsteemi mutantide ärkamiskineetika.

*CpxA* geeni poolt kodeeritud valk on osa CpxRA kahekomponendilisest signaalsüsteemist, kuhu kuuluvad ka geenide *cpxR* ja *cpxP* poolt kodeeritud valgud (Fleischer *et al.*, 2007). Et uurida, kas ka teistel Cpx süsteemi geenidel on roll muropeptiididest sõltuva statsionaarsest faasist väljumisele, võeti KEIO kollektsioonist mutandid, millest oli deleteeritud geenid *cpxR* ja *cpxP*, ja viidi läbi ärkamiskatse. Katsetest leiti, et *cpxP* geeni deleteerimisel (joonis 11) on muropeptiidide mõju ärkamisdünaamikale sarnane *wt* tüvele. Kui muropeptiidide preparaadi kontsentratsioon oli 1 µl või rohkem 100 µl kultuuri kohta, oli ärkamine kiirem võrreldes ärkamisega peptidoglükaani juuresolekul. Kui muropeptiidide preparaadi kontsentratsioon oli väiksem kui 0,5 µl 100 µl kultuuri kohta, siis ärkamiskiirus ei erinenud oluliselt kontrollist (peptidoglükaani juuresolekul ärkamiskiirusest). *cpxR* geeni deleteerimisel (joonis 12) oli ärkamiskineetika vähemalt sama hea kui *wt* tüvel. Mida kõrgem oli muropeptiidide kontsentratsioon, seda kiiremini toimus ka ärkamine.



**Joonis 11. *cpxP* mutandi ärkamiskineetika erinevate muropeptiidide kontsentratsioonide ja peptidoglükaani juuresolekul.** Lühend MP tähendab muropeptiide. Joonisel on toodud muropeptiidide ja peptidoglükaani preparaatide kontsentratsioonid 100 µl kultuuri kohta. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures suurenemise järgi ajas. Antud katset on korratud 3 korda. Joonisel on esitatud representatiivne tulemus.

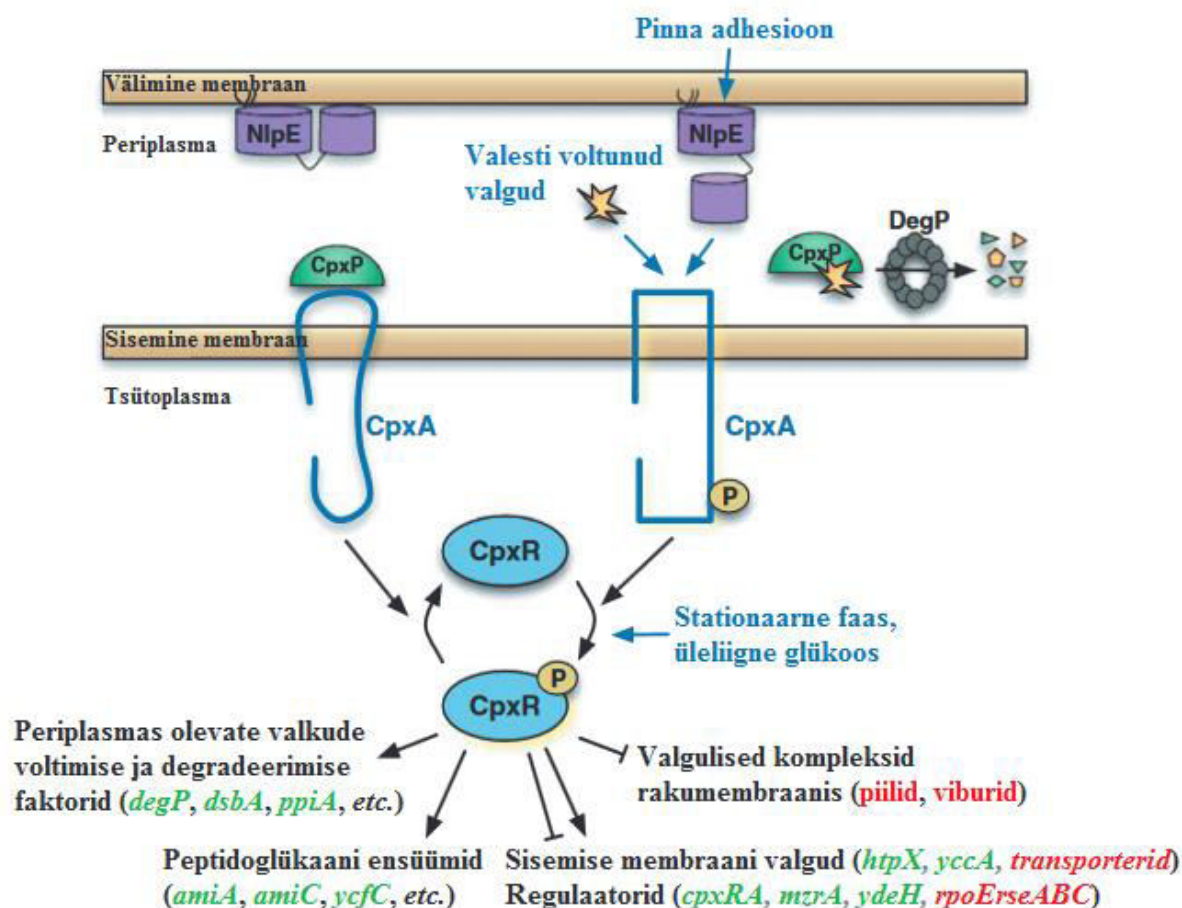


**Joonis 12. *cpxR* mutandi ärkamiskineetika erinevate muropeptiidide kontsentratsioonide ja peptidoglükaani juuresolekul.** Lühend MP tähendab muropeptiide. Joonisel on toodud muropeptiidide ja peptidoglükaani preparaatide kontsentratsioonid 100 µl kultuuri kohta. Statsionaarsest faasist väljumist jälgiti OD 600 nm juures suurenemise järgi ajas. Antud katset on korratud 3 korda. Joonisel on esitatud representatiivne tulemus.

## 2.4. Arutelu

Oma magistritöös üritasin ma identifitseerida geene, mis on seotud muropeptiididest sõltuva statsionaarsest faasist väljumisega bakteris *Escherichia coli*. Varasemalt on meie laboris testitud, kas muropeptiidid võiksid toimida läbi teadaolevate muropeptiidide metaboliseerimise radade kaudu, kuid leiti, et need rajad ei ole seotud kiirema ärkamisega (Marta Pereira, Arvi Jõers, avaldamata andmed). Kiirema statsionaarsest faasist väljumise indutseerimine toimub hetkel veel teadmata signaaliraja kaudu. Käesoleva tööga lootsingi saada rohkem teada antud signaalirajast.

Cpx signaalirada (joonis 13) on kahekomponentne signaalitransduktsiooni süsteem, mille kaudu tajutakse stressitingimustes kuhjunud valesti voltunud rakumembraanist pärit valkude hulga suurenemist periplasmas ning käivitatakse vastavad reparatsioonimehhanismid. Cpx regulatsioonisüsteemi kuulub transmembraanne sensorkinaas CpxA, mis koosneb periplasmaatilise domeenist ja konserveerunud tsütoplasmaatilise signaliseerimise domeenist. CpxA on võimeline autofosforüleeruma ja kandma fosfaatrühma üle vastuse regulaatorvalgule – CpxR-ile. CpxR-P aktiveerib või ka inhibeerib mitmete geenide transkriptsiooni (DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Peamiselt aktiveeritakse nende geenide transkriptsioon, millelt kodeeritakse periplasmas olevate valesti pakitud valkude elimineerimiseks vajalikke chaperone ja proteaase, ning inhibeeritakse nende geenide transkriptsioon, mis kodeerivad mitmeid mahukaid ja energiakulukaid valgulisi membraanikomplekse (Raivio, 2014). Lisaks on leitud, et CpxR-P mõjutab ka sisemise membraani valke, peptidoglükaani metaboliseerivaid ensüüme ja muid rakulisi regulaatoreid kodeerivate geenide ekspressiooni (Vogt & Raivio, 2012). CpxA aktiivsust reguleerib periplasmaatiline valk CpxP. Kui CpxP valk on seondunud CpxA periplasmaatilise domeeniga, on CpxA autokinaasne aktiivsus maha surutud. CpxA käitub sellisel juhul fosfataasina ja katalüüsib CpxR-P defosforüleerimist (Fleischer *et al.*, 2007). Kui aga periplasmas hakkavad stressi olukorras akumuleeruma valesti pakitud valgud, seondub CpxP nendega ning periplasmas olev DegP proteaas degradeerib tekkinud CpxP-valk kompleksid. CpxP degradeerimisel ei ole CpxA autokinaasne aktiivsus enam inhibeeritud ning ta võib autofosforüleeruda ja kanda fosfaatrühma üle regulaatorvalgule CpxR (Vogt & Raivio, 2012). Cpx signaalirada võib aktiveerida ka adhesioonil hüdrofoobsetele pindadele välismembraaniseoseline lipoproteiin NlpE (Otto & Silhavy, 2002), kuid aktivatsiooni täpne mehhanism ei ole teada.



**Joonis 13. Ülevaade Cpx signaalirajast bakteris *Escherichia coli*.** Mitte-stimuleeritud olekus (vasakpoolne diagramm) käitub CpxA fosfataasina ning hoiab vastuse regulaatorit CpxR defosforüleeritud olekus. Sellisena on CpxR inaktiivne. CpxP inhibeerib CpxA aktivatsiooni, tõenäoliselt läbi otsese kontaki. Cpx signaalirada võidakse stimuleerida mitmel viisil (märgitud siniste nooltega). Bakteri adhesioonil hüdrofoobsele pinnale aktiveerib välimine membraani lipoproteiin NlpE CpxA kinaasse aktiivsuse ning käivitab seeläbi Cpx signaalsüsteemi. Kui periplasmas kuhjuvad valesti voltunud valgud, siis aktiveeritakse samuti CpxA kinaasne aktiivsus läbi inhibiitorvalgu CpxP degradeerimise. Teatud kasvu ja tsentraalse metabolismiga seotud signaalide kaudu võidakse CpxR fosforüleerida ja aktiveerida ka ilma CpxA kaasabit. Stimuleeritud olekus (parempoolne diagramm) degradeerib proteaas DegP inhibiitormolekuli CpxP, CpxA autofosforüleerub ja annab fosfaatrühma edasi regulaatorvalgule CpxR, mis seondub DNA-ga, et reguleerida erinevate geenide transkriptsiooni. Ülesreguleeritud geenid on märgitud roheliselt ja allareguleeritud geenid punaselt (Vogt & Raivio, 2012; kohandatud).

Käesolevas töös leiti, et CpxA valku kodeeriva geeni deleteerimisel on muropeptiidide mõju statsionaarsest faasist väljumisele vähenenud, kuid CpxP ja CpxR valke kodeerivate geenide deleteerimisel tundlikkus muropeptiidide suhtes ei vähene. CpxA puudumisel võib CpxR saada fosfaatrühma ka atsetüül-fosfaadist, mida toodavad ensüümid fosfotransatsetülaas ja atsetaatkinaas atsetüül-CoA-st. Seega ei ole CpxA kinaasne aktiivsus tingimata vajalik, et

fosforüleerida CpxR-i (Wolfe *et al.*, 2008). Kuna CpxA võib käituda fosfataasina ja defosforüleerida CpxR-i ning seeläbi inhibeerida CpxR mõju erinevate geenide ekspressioonile (Fleischer *et al.*, 2007), siis CpxA puudumisel võib CpxR-P hulk suureneda ning bakteris on isegi stressi puudumisel stressivastuse rajad aktiveeritud. CpxR-P inhibeerib mitmeid gene, mis kodeerivad erinevaid rakupinnal olevaid valgulisi komplekse, nagu näiteks piilid ja viburid (Vogt & Raivio, 2012), OmpF poriinid (Batchelor *et al.*, 2005) ja muud transporterid (Raivio *et al.*, 2013). Võimalik, et bakteris *Escherichia coli* on olemas hetkel veel tundmatu pinnaretseptor, mis tunneb ära muropeptiide ekstratsellulaarses ruumis ja käivitab statsionaarsest faasist väljumise mehhanismid. CpxR-P võib inhibeerida energia säästmiseks ka selliste retseptorite ekspressiooni ning seetõttu vähenebki muropeptiidide mõju statsionaarsest faasist väljumise kiirusele *cpxA* mutandis.

Sarnaselt *cpxA* tüvele peaks ka *cpxP* tüves olema CpxR pidevalt aktiivne ja mõjutama muropeptiidide toimet. Fakt, et seda katses näha ei ole, viitab võimalusele, et ainult *cpxP* deleteerimisest ei piisa CpxR aktiveerimiseks ja eksisteerivad muud mehhanismid CpxA-CpxR reguleerimiseks.

Cpx signaalsüsteemi aktiveerimisel inhibeerib CpxR-P erinevaid transportereid kodeerivate geenide ekspressiooni (Raivio *et al.*, 2013). Cpx süsteem reguleerib ka mitmeid muid protsesse, mis moduleerivad rakuseina stabiilsust – ristsidemete arvu suurendamist peptidoglükaanis ja peptidoglükaankihi kindlamat sidumist välimise membraani külge (Surmann *et al.*, 2016). Selliste muudatuste tagajärjel võib rakuseina poorsus väheneda. Kui rakuseina poorsus ja transporterite arvukus väheneb, siis on võimalik, et muropeptiidid lihtsalt ei pääse rakku ega saa indutseerida rakkude kasvamahakkamist. Kui *cpxA* mutandis on Cpx signaalsüsteem pidevalt aktiivne, isegi stressi puudumisel, siis see võib seletada, miks just *cpxA*-d kodeeriva geeni deleteerimisel muropeptiidide mõju mutantide ärkamiskiirusele on vähenenud.

Käesolevas töös leiti skriinigu käigus lisaks katkestatud *cpxA* geeniga kloonidele ka sellised kloonid, kus oli transposooniga katkestatud *ompF* geen. OmpF (*outer membrane protein F*) on üks hüdrofiilsetest pooridest raku välimises membraanis, mis lubab väiksemate toitainetel ja signaalmolekulidel pääseda periplasmaatilisse ruumi. OmpF poriin koosneb periplasmaatilisel poolel olevast 8 lühikesest  $\beta$ -juuksenõela struktuurist ja ekstratsellulaarsel poolel olevast 8 pikast irregulaarsest *loop* struktuurist, mis on omavahel seotud antiparalleelsete  $\beta$ -ahelatega (kokku 340 aminohapet). Poriini saavad läbida ainult väiksemad

kui 600 Da suurused molekulid (Kefala *et al.*, 2010). On leitud, et need *E.coli* mutandid, millel ei ekspresseerita välimisel membraanil ompF poriine, on osade  $\beta$ -laktaamide (sh ampitsilliini) suhtes resistentsed (Harder *et al.*, 1981). See võib seletada, miks minu skriini käigus suurenes nende kloonide hulk kultuuris, kus transposoon oli katkestanud *ompF* geeni, kuid hilisemas katsetes *ompF* mutandid ikkagi reageerisid muropeptiididela sarnaselt *wt*-ga. Skriinimise käigus elimineeriti ampitsilliiniga need kloonid, mis reageerisid muropeptiididele ja mis hakkasid seetõttu kiiremini kasvama. *OmpF* geenikatkestusega kloonid võisid küll reageerida muropeptiididele ja varem kasvama hakata, aga kuna nad olid ampitsilliini suhtes vähem tundlikud, siis neid ei elimineeritud skriinimise faasis.

Edaspidises töös tuleks jätkata nende geenide identifitseerimist, mis võivad olla seotud muropeptiidide äratundmisega ja sellest sõltuvalt statsionaarsest faasist väljumise indutseerimisega.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli identifitseerida geenid, mis on seotud muropeptiididest sõltuva kiirema statsionaarsest faasist väljumisega. Skriiningu käigus leiti kolm *Escherichia coli* kloon, millele muropeptiidid ei avaldanud enam nii suurt mõju ärkamiskiirusele võrreldes *wt* tüvega. Nendes kloonides olid katkestatud geenid *cpxA* ja *ompF*. Edasistes katsetes leiti, et *ompF* geeni deleteerimisel avaldavad muropeptiidid mõju ärkamiskiirusele ainult kõrgemates kontsentratsioonides. OmpF on välismembraanis olev akvaporin, mis lubab väiksematel molekulidel läbida membraani. Selle puudumine võib takistada muropeptiidide pääsu periplasmasse, kuid vahed *wt* ja *ompF* mutandi vahel ei ole suured. Geeni *cpxA* deleteerimisel oli muropeptiidide mõju oluliselt vähenenud võrreldes *wt* tüvega. *CpxA* geeni poolt kodeeritud valk on osa CpxRA kahekomponendilisest signaalsüsteemist, mis on aktiivne just rakukesta ja -membraaniga seotud stressi puhul. Võimalik, et cpxRA signaaliraja kaudu inhibeeritakse mõnda tundmatut muropeptiidide retseptorit kodeeriva geeni ekspressiooni ja kui nende retseptorite ekspressioon on vähenenud, siis on vähenenud ka tundlikkus muropeptiididele. Teiseks on näidatud, et antud signaalrajaga inhibeeritakse mitmete transporterite sünteesi ja seetõttu on võimalik, et muropeptiidid ei pääse nii efektiivselt enam rakku, kui CpxRA signaalirada on aktiivne. CpxRA signaalsüsteemi kuuluvad ka CpxR ja CpxP. Neid valke kodeerivate geenide deleteerimisel jäi muropeptiidide mõju ärkamiskiirusele samasuguseks nagu *wt* tüveski.



## SUMMARY

### **Identifying the genes in *Escherichia coli* that affect muropeptide dependent exit from stationary phase**

Bacteria can survive growth-adverse conditions by entering metabolically inactive state. When living conditions improve, some of the bacteria re-initiate their growth. Growing and dividing bacteria might start to release signals into the medium that can induce exit from dormancy in the bacteria that are still dormant. For example, during the germination of *Bacillus subtilis* spores, cell wall muropeptides are released into the growth medium. They are recognized by other *Bacillus subtilis* spores and the dormant spores also re-initiate growth. Recently it was found out in our laboratory that muropeptides also induce exit from dormancy in *Escherichia coli* cells, but the exact mechanism how they do it is not known. In this work it was discovered that when deleting *cpxA* and *ompF* genes, the impact of muropeptides on the waking up kinetics is reduced. *ompF* encodes the outer membrane porin OmpF that allows passive diffusion of small molecules across the outer membrane. When bacteria are lacking these porins, muropeptides might not get across the outer membrane so easily and binding to receptor is hindered. Deleting *cpxA* gene has even bigger effect on muropeptide sensitivity. *CpxA* encodes a protein that is a part of the CpxRA two-component signalling system. This signalling system is activated during variety of envelope stresses. It is possible that through this signalling system the expression of the genes that encode still unknown muropeptide receptor are inhibited and therefore, muropeptide sensitivity is reduced. Two additional components of CpxRA system, CpxR and CpxP, do not play a role in muropeptide sensitivity of growth resumption.

## **TÄNUSÕNAD**

Eriline tänu läheb minu juhendajale Arvi Jõersile kannatlikkuse ja suurepärase juhendamise eest.

Suur tänu läheb ka Tanel Tensonile, Marta Putrinšile, Niilo Kaldalule ning ka ülejäänud antibiootikumide töögrupi liikmetele, kes olid väga abivalmid ja kelle poole sain alati pöörduda oma murega.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Adams, D.W., Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9): 642-653.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., ... Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008.

Bacun-Družina, V., Butorac, A., Mrvcic, J., Dragicevic, T. L., Stehlik-Tomas, V. (2011). Bacterial stationary-phase evolution. *Faculty of Food Technology and Biotechnology*: 49(1): 13-23.

Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690): 1622-1625

Batchelor, E., Walther, D., Kenney, L.J., Goulian, M. (2005). The *Escherichia coli* CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC. *Journal of Bacteriology*, 187(16):5723-5731.

Berman, J., Sudbery, E. (2002). *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics*, 3(12): 918-930.

Bosco-Drayon, V., Poidevin, M., Boneca, I.G., Narbonne-Reveau, K., Royet, J., Charroux, B. (2012). Peptidoglycan Sensing by the Receptor PGRP-LE in the *Drosophila* Gut Induces Immune Responses to Infectious Bacteria and Tolerance to Microbiota. *Cell Host & Microbe*, 12(2): 153-165.

Boudreau, M. A., Fisher, J. F., Mobashery, S. (2012). Messenger functions of the bacterial cell wall-derived muropeptides. *PMS Biochemistry*, 51(14): 2974-2990.

Chaput, C. & Boneca, I.G. (2007). Peptidoglycan detection by mammals and flies. *Microbes and Infection*, 9: 637-647.

Cloud-Hansen, K.A., Peterson, S.B., Stabb, E.V., Goldman, W.E., McFall-Ngai, M.J., Handelsam, J. (2006). Breaching the great wall peptidoglycan and microbial interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9): 710-716.

Das, S., Noe, J.C., Palk, S., Kitten, T. (2005). An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites. *Journal of Microbiological Methods*, 63(1): 89-94.

DiGiuseppe, P.A. & Silhavy, T.J. (2003). Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System. *Journal of Bacteriology*, 185(8): 2432-2440.

Dworkin, J. (2014). The Medium Is the Message: Interspecies and Interkingdom Signaling by Peptidoglycan and Related Bacterial Glycans. *Annual Review of Microbiology*, 68(5): 137-154.

Dworkin, J., Shah, I. M. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12): 890-896.

Fleischer, R., Heermann, R., Jung, K., Hunke, S. (2007). Purification, Reconstitution, and Characterization of the CpxRAP Envelope Stress System of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12): 8583-8593.

Gasol, J.M., del Giorgio, P.A., Massana, R., Duarte, C.M. (1995). Active versus inactive bacteria: size-dependence in a coastal marine plankton community. *Marine Ecology Progress Series*, 128(11): 91-97.

Harder, K.J., Nikaido, H., Matsushashi, M. (1981). Mutants of *Escherichia coli* That Are Resistant to Certain Beta-Lactam Compounds Lack the ompF Porin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20(4): 549-552.

Hett, E.C., Rubin, E.J. (2008). Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 72(1): 126-156.

- Jacobs, C., Frere, J.-M., Normark, S. (1997). Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible  $\beta$ -Lactam resistance in Gram-negative bacteria. *Cell*, 88(6): 823-832.
- Johnson, J.W., Fisher, J.F., Mobashery, S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences, Antimicrobial Therapeutics Reviews*, 1277(1): 54-75.
- Jøers, A. & Tenson, T. (2016). Growth resumption from stationary phase reveals memory in *Escherichia coli* cultures. *Scientific Reports*, 6: article number 24055.
- Jøers, A., Kaldalu, N., Tenson, T. (2010). The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *Journal of Bacteriology*, 192(13): 3379-3384.
- Keep, N.H., Ward, J.M., Cohen.Gonsaud, M., Henderson, B. (2006). Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Elsevier, TRENDS in Microbiology*, 14(6): 271-276.
- Kefala, G., Ahn, C., Krupa, M., Esquivies, L., Maslennikov, I., Kwiatkowski, W., Choe, S. (2010). Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12. *Protein Science*, 19(5):1117-1125.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D., Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6): 423-435.
- Libby, E.A., Gross, L.A., Dworkin, J. (2015). The Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase PrkC Regulates the Essential WalRK Two Component System in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genetics*, 11(6): e1005275.
- Lindquist S., Lindberg, F., Normark, S. (1989). Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR Regulator to a Single DNA Site Provides Both Autoregulation and Activation of the Inducible *ampC*  $\beta$ -Lactamase Gene. *Journal of Bacteriology*, 171(7): 3746-3753

Mukamolova, G.V., Karpelyants, A.S., Young, D.I., Young, M., Kell, D.B. (1998). A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95(15): 8916-8921.

Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Young, M. (2006). Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Molecular Microbiology*, 59(1): 84-98.

Neidhardt, F.C. Bloch, P.L., Smith, D.F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology* 119(3): 736-747.

Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Kaprelyants, A.S. (2016). Rpf Proteins Are the Factors of Reactivation of the Dormant Forms of Actinobacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 81(13): 1719-1734.

Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Shleeve, M.O., Kaprelyants, A.S. (2013). Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of „non-culturable“ mycobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(8): 37-46.

Oldroyd, G.E.D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4): 252-263.

Oliver, J.D. (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *Journal of Microbiology*, 43(2): 93-100.

Otto, K., Silhavy, T.J. (2002) Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99(4): 2287–2292.

Park, J.T., Uehara, T. (2008). How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2): 211-227.

- Raivio, T.L. (2014). Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(8): 1529-1541.
- Raivio, T.L., Leblanc, S.K.D., Price, N.L. (2013). The *Escherichia coli* Cpx Envelope Stress Response Regulates Genes of Diverse Function That Impact Antibiotic Resistance and Membrane Integrity. *J. Bacteriol.*, 195(12): 2755-2767.
- Reith, J., Mayer, C. (2011). Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1): 1-11.
- Royet, J., Dziarski, R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 5(4): 265-277.
- Setlow, P. (2008). Dormant Spores Receive an Unexpected Wake-up Call. *Cell*, 135(3): 410-412.
- Shah, I., Dworkin, J. (2010). Induction and regulation of a secreted peptidoglycan hydrolase by a membrane Ser/Thr kinase that detects muropeptides. *Molecular Biology*, 75(5): 1232-1243.
- Shah, I., M., Laaberki, M.-H., Popham, D. L., Dworkin, J. (2008). A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. *Cell*, 135(3): 486-496.
- Signoretto, C., Lleo, M., Canepari, P. (2002). Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Current Microbiology*, 44(2): 125-131.
- Simonetti N, Strippoli V, Cassone A. (1974). Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature*, 250(7): 344-346
- Spoel, S.H. & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2): 89-100.

- Stevenson, L. H. (1978). Case for bacterial dormancy in aquatic systems. *Microbiology Ecology*, 4(2): 127-133
- Surmann, K., Cudic, E., Hammer, E., Hunke, S. (2016). Molecular and proteome analyses highlight the importance of the Cpx envelope stress system for acid stress and cell wall stability in *Escherichia coli*. *Microbiology Open*, 5(4): 582-596.
- Zeng, X., Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 128(4): 1-9.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., Fagarasan, S. (2008). Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T-Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity*, 29(2): 261-271
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., Vollmer, W. (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Review Microbiology*, 10(2): 123-136.
- Vogt, S.L., Raivio, T.L. (2012). Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiology Letters*, 326(1): 2-11.
- Wolfe, A.J., Parikh, N., Lima, B.P., Zemaitaitis, B. (2008). Signal Integration by the Two-Component Signal Transduction Response Regulator CpxR. *Journal of Bacteriology*, 190(7): 2314-2322.
- Vollmer, W., Blanot, D., Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Review*, 32(2): 149-167.
- Xu, X.L., Lee, R.T., Fang, H.M., Wang, Y.M., Li, R., Zou, H., Zhu, Y., Wang, Y. (2008). Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. *Cell Host Microbe*, 4(1): 28-39.



## LIHTLITSENTS

### **Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Regina Maruste

(sünnikuupäev: 29.08.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „Muropeptiidide toimel statsionaarsest faasist väljumist mõjutavate geenide identifitseerimine bakteris *Escherichia coli*“, mille juhendaja on Arvi Jõers,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017